



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Aislamiento de bacteriófagos de Pseudomonas aeruginosa multidrogo – resistente en aguas de tres ríos de la Provincia de Lima-Perú

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Ivone Alexandra GARCÍA SALAZAR

Mauricio Yvan PORRAS NICHÓ

ASESOR

Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

García I, Porras M. Aislamiento de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente en aguas de tres ríos de la Provincia de Lima-Perú [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“Aislamiento de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente en aguas de tres ríos de la Provincia de Lima -Perú”

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**IVONE ALEXANDRA GARCÍA SALAZAR Y
MAURICIO YVAN PORRAS NICHÓ**


Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECINUEVE (19) CON MENCIÓN

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 28 de agosto de 2018.


Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Presidente


Dr. Víctor Crispín Pérez
Miembro


Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Miembro


Mg. Oscar Acosta Conchucos
Miembro

“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

DEDICATORIA

A mi familia, por su incondicional apoyo a lo largo de este camino, en especial a mi papá Armando Rudecindo García Rosas y sobre todo a mi mamá Emperatriz Ana Salazar Tinoco, por enseñarme con su ejemplo que no existe cansancio que valga cuando se trata de perseguir tus sueños.

Ivone Alexandra García Salazar

A mi familia por su apoyo, en especial a mi tía Lita, a mi madrina Teresa, a mi hermano Renato, a mis padres que están en el cielo iluminando mi sendero, y aún más a mi madre María Ermilda Nicho Zapata, por su interminable amor, esfuerzo y dedicación, por ser padre y madre 7 años, esto es para y por ti.

Mauricio Yvan Porras Nicho

AGRADECIMIENTOS

Nuestro más sincero agradecimiento a nuestro asesor Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz, por transmitir su conocimiento, por sus consejos, por su apoyo y por su infinita paciencia. Gracias totales, Doctor.

Igualmente agradecemos al Vicerrectorado de Investigación (VRI) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el apoyo y financiamiento de nuestra investigación (A17040394b).

Asimismo, agradecemos a los miembros del jurado evaluador y calificador:

- Dra. María Elena Salazar Salvatierra
- Dr. Víctor Crispín Pérez
- Dr. Óscar Acosta Conchucos
- Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa

Por sus enriquecedoras observaciones y sugerencias.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
ABREVIATURAS	x
GLOSARIO DE TÉRMINOS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	4
A. Objetivo General	4
B. Objetivos específicos	4
III. GENERALIDADES	5
A. Antecedentes	5
B. Marco teórico	10
a. Resistencia antimicrobiana	10
b. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
c. Resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
d. Bacteriófagos	22
e. Técnicas de enumeración e identificación de bacteriófagos	30
IV. HIPOTESIS.....	34
V. PARTE EXPERIMENTAL	34
A. Tipo y diseño de Investigación	34
C. Materiales y medios	34
D. Metodología	35
a. Obtención de cepas bacterianas	35
b. Perfil de sensibilidad de las cepas bacterianas	36
c. Obtención de muestras de agua	37
d. Aislamiento de bacteriófagos por enriquecimiento	37
e. Determinación de la presencia de bacteriófagos por Prueba de la Gota (Spot test)	38
f. Cuantificación (o Enumeración) de bacteriófagos: Técnica de doble capa	38
g. Purificación de bacteriófagos	40
h. Caracterización parcial de bacteriófagos	41
Cinética de los bacteriófagos: Curva de crecimiento de un solo paso	41

Constante de adsorción	42
Efecto del cloruro de calcio (CaCl_2) en la adsorción de los bacteriófagos ..	43
Efecto de la temperatura en el título de los bacteriófagos	43
VI. RESULTADOS	44
A. Perfil de sensibilidad de las cepas bacterianas.....	44
B. Aislamiento y determinación de la presencia de bacteriófagos: Prueba de la Gota (Spot test)	44
C. Cuantificación de bacteriófagos: Técnica de doble capa	45
D. Cinética de los bacteriófagos: Curva de crecimiento de un solo paso	46
E. Constante de adsorción	49
F. Efecto del cloruro de calcio en la adsorción de los bacteriófagos	50
G. Efecto de la temperatura en el título de los bacteriófagos	53
VII. DISCUSIÓN	54
VIII. CONCLUSIONES	65
IX. RECOMENDACIONES.....	66
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	77
ANEXO I: ESQUEMA AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS Y PRUEBA DE LA GOTA.....	78
ANEXO II: ESQUEMA ENUMERACIÓN POR TÉCNICA DE LA DOBLE CAPA	79
ANEXO III: ESQUEMA CINÉTICA POR CURVA DE UN SOLO PASO	80
ANEXO IV: ESQUEMA CINÉTICA DE ADSORCIÓN	81
ANEXO V: ESQUEMA EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y propiedades básicas de los bacteriófagos.....	23
Tabla 2. Perfil de sensibilidad de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Tabla 3. Codificación de los lisados positivos para la prueba de la gota.	45
Tabla 4. Título obtenido de cada lisado de bacteriófagos	46
Tabla 5. Valores del periodo de latencia y tamaño de explosión de los lisados seleccionados.....	48
Tabla 6. Constantes de adsorción de los lisados seleccionados.	49
Tabla 7. Comparación de las constantes de adsorción de los lisados seleccionados en presencia de cloruro de calcio versus las constantes de adsorción de los mismos en ausencia de éste.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prioridad de desarrollo e investigación de nuevos antibióticos.....	12
Figura 2. Fechas del descubrimiento de distintas clases de antibacterianos.....	14
Figura 3. Representación gráfica de los principales grupos de fagos.....	24
Figura 4. Estructura del bacteriófago T4.....	25
Figura 5. Fases del ciclo líticos de los bacteriófagos.....	29
Figura 6. Esquema de los ciclos lítico y lisogénico (correspondiente al fago λ)...	30
Figura 7. Prueba de la gota de los 10 filtrados con resultado positivo	45
Figura 8. Enumeración de bacteriófagos por Técnica de Doble capa del LR1	46
Figura 9. Curvas de un solo paso de los lisados seleccionados.....	47
Figura 10. Curvas de un solo paso de los lisados seleccionados (continuación)	48
Figura 11. Perfil de adsorción de los lisados seleccionados.....	49
Figura 12. Ensayo de adsorción del lisado LC1.....	50
Figura 13. Perfil de adsorción de los lisados seleccionados en ausencia de iones metálicos divalentes.	51
Figura 14. Comparación de los perfiles de adsorción de los lisados seleccionados en presencia y ausencia de CaCl_2	52
Figura 15. Efecto de la temperatura en el título de bacteriófagos.....	53

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana constituye un problema actual y creciente que tiene un impacto tanto en la economía como en la salud pública. Esta resistencia se ha observado principalmente, según la OMS, en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, la cual pertenece al grupo prioritario de patógenos para los cuales se necesita urgentemente nuevos tratamientos efectivos. En este contexto la fagoterapia surge como una alternativa terapéutica. Por esta razón este estudio busca obtener bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo-resistente a partir de muestras de agua de tres ríos de la provincia de Lima – Perú. Esta investigación logró aislar dichos bacteriófagos a partir de las muestras de los ríos Rímac y Chillón. Estos fueron caracterizados de acuerdo con los parámetros cinéticos de periodo de latencia, tamaño de explosión y tasa de adsorción. Los periodos de latencia oscilaron, en su mayoría, entre 0 y 10 minutos; los tamaños de explosión variaron desde 15 UFP/célula hasta 3688 UFP/célula y las tasas de adsorción oscilaron entre $1,91 \times 10^{-9}$ mL/min y $1,32 \times 10^{-8}$ mL/min. Además, se evaluó la estabilidad térmica de los lisados a 50°C, 60°C, 70°C y 80°C, siendo el lisado denominado LR2 el que mostró una mejor estabilidad térmica a 50°C e incluso soportó temperaturas de 60°C y 70°C por un corto periodo de tiempo. Finalmente, el estudio evaluó el efecto de la presencia de Ca^{+2} en la tasa de adsorción de los bacteriófagos; sin embargo, no se logró establecer una relación entre ambos ya que en uno de los casos la presencia del ion divalente Ca^{+2} aumentó la tasa de adsorción; en otro la disminuyó; y en un tercer caso no pareció alterarla.

Palabras clave: bacteriófago, multidrogo – resistente, periodo de latencia, tamaño de explosión, adsorción, estabilidad térmica, ion divalente

ABSTRACT

The antimicrobial resistance is a current and increasing problem that have an impact either in economy and in public health. This resistance has been observed principally, according to WHO, in bacteria like *Pseudomonas aeruginosa*, which belong to priority group of pathogens for which it is needed, urgently, new effective therapies. In this context phagotherapy emerges as a therapeutic alternative. For this reason, this study looks for getting bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant from water samples of three rivers from Lima – Peru. In this study, bacteriophages against clinical strains of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from water samples of Rímac and Chillón rivers. They were characterized by measuring kinetic parameter of latent period, *burst size* and rate of attachment. Latent periods ranged, mostly, between 0 and 10 minutes; *burst sizes* varied since 15 UFP/cell to 3688 UFP/cell and rates of attachment ranged between $1,91 \times 10^{-9}$ mL/min and $1,32 \times 10^{-8}$ mL/min. In addition, the thermal stability of the lysates at 50°C, 60°C, 70°C and 80°C was evaluated, being the lysate named LR2 the one that showed a better thermal stability at 50°C, and even endured temperatures of 60°C and 70°C during a short period of time. Finally, the study assessed the effect of the presence of Ca^{+2} on the bacteriophages rate of attachment; however, the relationship between both of them was not established since the presence of the divalent ion Ca^{+2} increased the rate of attachment in one case, decreased it on another case, and it didn't seem to change it.

Key words: bacteriophage, multidrug resistant, latent period, *burst size*, attachment, thermal stability, divalent ion

ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
CaCl₂	Cloruro de calcio
dsADN	ADN de doble cadena o bicatenario
dsARN	ARN de doble cadena o bicatenario
OMS	Organización Mundial de la Salud
RPM	Revoluciones por minuto
ssADN	ADN de una sola cadena o monocatenario
ssARN	ARN de una sola cadena o monocatenario
UFC/mL	Unidad formadora de colonia por mililitro
UFP/mL	Unidad formadora de placa por mililitro

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ARN polimerasa:	Enzima que cataliza la formación de ARN a partir de ribonucleósidos 5'- trifosfato utilizando una hebra de ADN o ARN como molde.
Bacteriófago T4:	Bacteriófago de dsADN.
Cápside:	Cubierta proteica que encierra y protege al genoma de un virus.
Capsómero:	Varias proteínas estructurales virales que se reúnen para formar subunidades idénticas que generan la cápside de un virus.
Endolisina:	Enzima que permite que los virus escapen o sean liberados del huésped; hidrolizan enlaces específicos en la mureína o capa de peptidoglucano de la pared celular.
Fagoterapia:	Tratamiento de las infecciones bacterianas mediante bacteriófagos.
Holina:	Enzima utilizada por los bacteriófagos para crear poros en la membrana interna de la célula huésped para facilitar la lisis del huésped y la liberación del bacteriófago.
Huésped:	Organismo sobre o en el cual un organismo vive y crece o un virus se replica.
Mureína:	Componente mayoritario de las paredes celulares bacterianas; generalmente consiste en heteropolisacáridos paralelos entrecruzados con péptidos cortos.
Placa:	Área clara en una placa de cultivo bacteriano o en una monocapa en la que lo virus destruyeron a la célula.
Virión:	Partícula vírica.

I. INTRODUCCIÓN

Es innegable que la resistencia antimicrobiana constituye un problema actual y creciente, y que se ha convertido en una seria preocupación en los sistemas de salud de todo el mundo, siendo de especial cuidado el caso de las infecciones multidrogo-resistentes (MDR). Ésta tiene un impacto económico tanto en los sistemas de salud como en las mismas familias. Los problemas de resistencia antimicrobiana incrementan los costos, ya que al no ser efectivos los fármacos de primera línea será necesario el uso de terapias más costosas. Del mismo modo, una infección resistente conllevará a más días de hospitalización, incrementando de esta manera el costo de la atención de salud (1). Esto se refleja en estudios que muestran que, en la Unión Europea, se pierdan 1,5 miles de millones de euros a causa de infecciones bacterianas MDR (2) mientras que en Estados Unidos se gasten más de 20 mil millones de dólares al año en el cuidado de la salud (3). Por otro lado, la resistencia no solo repercute en la economía, sino que también pone en riesgo los logros en la salud, ya que sin antibióticos efectivos para la prevención y tratamiento de infecciones se puede comprometer el éxito de trasplantes de órganos, quimioterapias y cirugías mayores (1).

En febrero del 2017, la OMS desarrolló una lista global de patógenos resistentes a antibióticos prioritarios para los que, urgentemente, se necesita nuevos tratamientos efectivos. Estos se clasifican según prioridad, siendo *Pseudomonas aeruginosa* una de las bacterias que componen el grupo de prioridad crítica (4).

Esta es causa frecuente de infecciones severas adquiridas en el hospital como neumonía asociada al ventilador (5) y septicemia, siendo esta fatal en el 38,7% de los casos (6); así como de diversas infecciones de la piel, ojos y vías urinarias, siendo los más propensos a ellas los sujetos inmunosuprimidos o con tratamientos

inmunosupresores tales como pacientes con fibrosis quística, heridas por quemaduras, SIDA, cáncer, úlceras de diferente origen o aquellos intubados en unidades de cuidados intensivos (6,7). Asimismo, esta es capaz de desarrollar múltiples mecanismos de resistencia, cada uno de los cuales conlleva a la pérdida de susceptibilidad frente a diferentes antibióticos (5,8).

Se ha encontrado que, en Latinoamérica, la susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a diversos antibióticos disminuye anualmente y que la probabilidad de encontrar cepas resistentes a diversos antibióticos va en aumento (9), siendo la colistina, desde hace algunos años, el único antibiótico activo contra *Pseudomonas aeruginosa* MDR; sin embargo, recientemente se han encontrado cepas resistentes a ella, generando una alerta en cuanto a un posible brote epidémico serio en condiciones hospitalarias (7).

Es importante resaltar que, en los últimos años, no se han dado a conocer nuevos antibióticos disponibles en el mercado. Entre el 2003 y el 2007, solo se han aprobado 5 nuevos agentes antibacterianos en Estados Unidos y se estima que solo alrededor de 6 compañías farmacéuticas en Estados Unidos y Europa mantienen activos programas de Investigación y Desarrollo para antibióticos (10). Esta notable pérdida de interés de las compañías farmacéuticas en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos se debe a diversos factores, entre ellos, la gran cantidad de antibióticos genéricos disponibles en el mercado, siendo considerados como primera línea de terapia por parte de las autoridades públicas sanitarias, la poca rentabilidad de este tipo de tratamientos – a corto plazo – frente a medicamentos usados en enfermedades crónicas o la serie de requisitos regulatorios para la aprobación de nuevos agentes antibacterianos, tales como ensayos clínicos del nuevo medicamento enfrentado a un placebo (10).

Por todo ello, se ha vuelto imperativa la búsqueda de una nueva alternativa de terapia contra las infecciones de *Pseudomonas aeruginosa* MDR, lo que ha hecho que se abra nuevamente, después de décadas, el interés en los bacteriófagos, virus que infectan específicamente bacterias y que además abundan en la biósfera. Es por ello que esta investigación buscó aislar bacteriófagos contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos a partir de aguas servidas de tres ríos de la provincia de Lima-Perú y caracterizarlos parcialmente.

II. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

A. Objetivo General

- Obtener bacteriófagos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente de aguas de tres ríos de la provincia de Lima-Perú.

B. Objetivos específicos

- Aislar bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente a partir de muestras de agua de tres ríos de la provincia de Lima-Perú.
- Realizar el antibiograma de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM).
- Analizar la cinética de acción de los bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente obtenidos a partir de muestras de agua de tres ríos de la provincia de Lima-Perú.
- Analizar la estabilidad térmica de los bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente obtenidos a partir de muestras de agua de tres ríos de la provincia de Lima-Perú.
- Analizar los efectos de “iones metálicos divalentes” sobre la tasa de adsorción de los bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente aislados a partir de muestras de agua de tres ríos de la provincia de Lima-Perú.

III. GENERALIDADES

A. Antecedentes

En 1896, el bacteriólogo inglés Ernest Hankin, al tratar de enumerar *Vibrio cholerae* en el río Ganges, encontró que las unidades infectivas por metro cúbico se reducían ampliamente sin razón aparente desde la entrada del río a la ciudad hasta la salida de este. Esta extraña auto-purificación fue llamada “fenómeno de Hankin”. Dos años después, Gamaleya publicó un artículo en el cual describía la lisis de *Bacillus anthracis* en agua destilada (11).

Entre 1906 y 1909, Felix d’Herelle condujo varios experimentos en México, Tunes y Guyana, aislando *Coccobacillus aeridorium* (actualmente conocido como *Enterobacter aerogenes*) a fin de usarla contra la plaga de langostas. Al observar los cultivos, se encontró con zonas transparentes en el lecho bacteriano mas no les tomó mayor importancia en ese entonces (11).

No fue hasta 1915 que se dio la primera publicación acerca de este fenómeno. Frederick Twort publicó en *The Lancet* un artículo sobre “lisis bacteriana transmisible” en el cual describió la observación de “bordes comidos” de colonias de *Staphylococcus*. Twort logró obtener filtrados de este cultivo y lo aplicó en cultivos de diferentes cepas de *Staphylococcus*, observando nuevamente dichas zonas claras de lisis. Esta fue la primera publicación sobre bacteriófagos; sin embargo, aún no pudo explicar el evento, sólo describirlo. Felix d’Herelle leyó el mencionado artículo y, recordando sus observaciones en México y Tunes, sospechó que el agente filtrado era un virus bacteriano – un invasor invisible que destruye bacterias (11).

En el mismo año, se le asignó a d’Herelle una investigación sobre un brote de disentería hemorrágica entre las tropas francesas en las afueras de París.

Para ello, realizó filtrados a partir de muestras fecales de los pacientes y cepas de *Shigella* aisladas de dichos pacientes; al sembrarlos en agar e incubarlos con el fin de observar el crecimiento de la bacteria, observó nuevamente la aparición de pequeñas áreas claras que posteriormente serían llamadas *placas*. Además, presentó sus hallazgos en 1917 y propuso que la causa de este fenómeno era un virus capaz de parasitar bacterias, proponiendo también el nombre de “bacteriófago” (de “bacteria” y del griego *phagein* “comer”). De esa manera, d’Herelle desarrolló la idea de usar bacteriófagos para el tratamiento de enfermedades bacterianas tanto en humanos como en animales, usándolos primero en casos de disentería. Desde ese momento, tomaron lugar diversos ensayos con bacteriófagos para tratar o prevenir otras infecciones como enfermedades estafilocócicas estreptocócicas, peste bubónica o cólera; esta última abordada en conjunto por d’Herelle y George Eliava en 1931, obteniendo resultados alentadores. Incluso, empezaron a comercializarse las primeras preparaciones a base de bacteriófagos; sin embargo, la controversia a cerca de su eficacia sumado a la llegada de la era de los antibióticos hizo que la producción de fagos terapéuticos cesara en la mayoría de los países occidentales, mas no en la Unión Soviética, donde d’Herelle y Eliava fundaron el Instituto de Bacteriófagos en Tbilisi (Georgia) y la producción de bacteriófagos continúa y satisface las necesidades del mercado georgiano en cuanto a terapias antibacterianas (11).

Sin embargo, la aparición de cepas patógenas resistentes a diversos antibióticos de hoy en día, el cese del desarrollo de nuevos antibióticos y la rápida pérdida de eficacia de estos para tratar infecciones, han hecho que laboratorios de todo el mundo volteen a dar una mirada al olvidado mundo de

los bacteriófagos, los cuales poseen un gran potencial en la práctica clínica (7,11); siendo algunas de sus ventajas poseer un mecanismo de acción diferente a los antibióticos, ser muy específicos – impidiendo que la microflora normal sea afectada, ser capaces de multiplicarse exponencialmente y en el sitio de acción, ser ecológicamente seguros – siendo inocuos para los humanos, plantas o animales; además, sus preparaciones son fácilmente reproducibles, fáciles de aplicar y no parecen mostrar reacciones adversas (12,13).

A lo largo de los años, se han llevado a cabo diferentes estudios enfocados en la terapia con bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*, ya sea en modelos experimentales en animales o en “ensayos clínicos” en humanos. El tratamiento experimental de septicemias, infecciones intestinales, dérmicas, pulmonares, óticas, entre otras, han arrojado resultados alentadores ya sea en cuanto a disminución del recuento bacteriano, evolución de la enfermedad, disminución de la frecuencia de infecciones nosocomiales o en disminución de la mortalidad, en el caso de modelos experimentales animales (6,7).

Santos y col. (2011) realizaron el aislamiento de dos bacteriófagos contra *Pseudomonas aeruginosa*. Los fagos aislados fueron nominados P5U5 y P2S2 y fueron caracterizados evaluando sus rangos de huésped, morfología, perfil genético y estabilidad frente a diferentes temperaturas y pH. Luego evaluaron su efecto sobre 26 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de perros con infecciones oculares oportunistas. P5U5 resultó ser activo frente a todas las cepas, mientras que P2S2 lo fue en el 80.8% de ellas (21 cepas) (14).

Un año después, Karumidze y col. caracterizaron dos fagos de *Pseudomonas* como candidatos para usarse como agentes terapéuticos. Se evaluó su morfología, rango de huésped, propiedades de crecimiento, estabilidad térmica, secuencia genómica, etc. Ambos fagos mostraron actividad lítica frente a 200 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* evidenciándose mediante la formación de placas claras (15).

En el 2015, se publicó un artículo en el que Kwiatak y col. caracterizaron 5 fagos (WP1, WP2, WP3, WP4, WP5) ya purificados como candidatos para su posible uso como terapia para fagos. En este trabajo también fueron evaluados sus rangos de huésped, tamaños de genoma, proteínas estructurales y sus estabilidades frente a diferentes condiciones físicas y químicas. Los fagos WP3, WP2 y WP5 fueron activos frente al 42,1%, 36,8% y 31,5% de las cepas hospederas elegidas; mientras que WP1 y WP4 sólo mostraron actividad frente al 21% y 15.7% de las cepas, pero todos los fagos exhibieron placas claras indicando un ciclo de vida lítico (16).

En el mismo año, Cao y col. aislaron un bacteriófago específico para *Pseudomonas aeruginosa* denominado PPA-ABTNL a partir de aguas residuales hospitalarias. Este mostró tener un amplio rango de huésped frente a diferentes cepas y también fue caracterizado en relación a sus parámetros cinéticos y un análisis genómico; pero además evaluaron su toxicidad y su efectividad como agente terapéutico en un modelo animal experimental, demostrando su potencial como tratamiento efectivo (por vía inhalatoria) contra infecciones por dicha bacteria (17).

También en el 2015, se publicó un artículo en el cual Didamony y col. aislaron dos fagos contra *Pseudomonas aeruginosa* a partir de aguas servidas en

Zagazig, Egipto. Estos fueron denominados ϕ PSZ1 y ϕ PSZ2, fueron caracterizados mediante su morfología, sus parámetros cinéticos y su estabilidad frente a diferentes temperaturas. Además, mostraron ser efectivos contra 13 diferentes cepas pero no contra otras bacterias (18).

Finalmente, entre los años 2015 y 2016, Alsaffar y Jarallah aislaron un bacteriófago a partir de muestras de aguas residuales enfrentadas a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Este bacteriófago fue nombrado Phage1 y fue caracterizado mediante la observación de las placas formadas (forma y diámetro), hallando sus parámetros cinéticos (constante de adsorción, tamaño de explosión) y su estabilidad frente a diferentes temperaturas y pH. Se probó su rango de huésped frente a 40 cepas provenientes de quemaduras, orina, salas de operaciones, entre otros, siendo todas susceptibles al Phage1 (19).

B. Marco teórico

a. Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana, según la OMS, es aquel proceso que ocurre cuando microorganismos como bacterias, virus, hongos y/o parásitos cambian al ser expuestos a medicamentos antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivirales, antihelmínticos, etc.) afectando la prevención y tratamiento efectivo de las infecciones causadas por aquellos (1,20).

Estos cambios en los microorganismos ocurren de manera natural por cambios genéticos en ellos, pero el uso irracional de los antimicrobianos en los sectores de la salud animal, alimentaria, agricultura y acuicultura, falta de acceso a servicios de salud básico, residuos de antimicrobianos en suelos, cultivos y agua aceleran este proceso (1,20–22). Las bacterias tienden a adquirir resistencia de manera natural mediante mutaciones a nivel genético. Los antibióticos inducen una presión selectiva y los genes actúan en asociación con ella. Las bacterias también poseen la cualidad de transferir directamente material genético de una a otra mediante plásmidos. La resistencia también puede desarrollarse por la interrupción de un tratamiento antibiótico; las bacterias permanecen intactas y ganan mayor fuerza contra los antibióticos. Las bacterias pueden ir adquiriendo múltiples rasgos de resistencia a través del tiempo volviéndose resistentes a diferentes clases de antibióticos (22,23).

Siendo este el panorama de la resistencia antimicrobiana actual, la amenaza a la salud pública mundial es muy seria y en riesgo creciente

exponencial, dado que al disminuir el abanico de tratamientos efectivos peligran el éxito de la mayoría de las cirugías, quimioterapias, trasplantes y/o manejo de múltiples enfermedades que afectan a la sociedad, así como un aumento sustancial en el costo en salud (con infecciones resistentes es mayor la duración de la enfermedad y por tanto la estancia hospitalaria), necesidad de exámenes más especializados, cuidados más intensivos y uso de medicamentos más costosos, con ello no solo peligra la salud sino que podría incluso terminar con la muerte del paciente (1,24).

La mayoría de las víctimas a causa de la resistencia antimicrobiana se encuentran en los países en vías de desarrollo (25). Así, se proyecta que, para el 2050, ocurran alrededor de 10 millones de muertes a nivel global atribuidas a esta causa, 9 millones en los países en desarrollo: 4.7 millones en Asia, 4.2 millones en África y 392 000 en América Latina (25).

La OMS publicó la primera lista de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos., compuesta por 12 familias de bacterias que representan la mayor amenaza a la salud humana (Figura 1); esto con el fin de promover la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos efectivos contra ellos. Resalta, en particular, la amenaza de las bacterias gram-negativas, las cuales son resistentes a múltiples antibióticos. Estas han encontrado nuevas maneras de resistir a los tratamientos actuales y pueden transferir material genético que permita que otras bacterias se vuelvan resistentes también (26).

La lista está dividida en tres categorías según la urgencia de nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta y media (26).

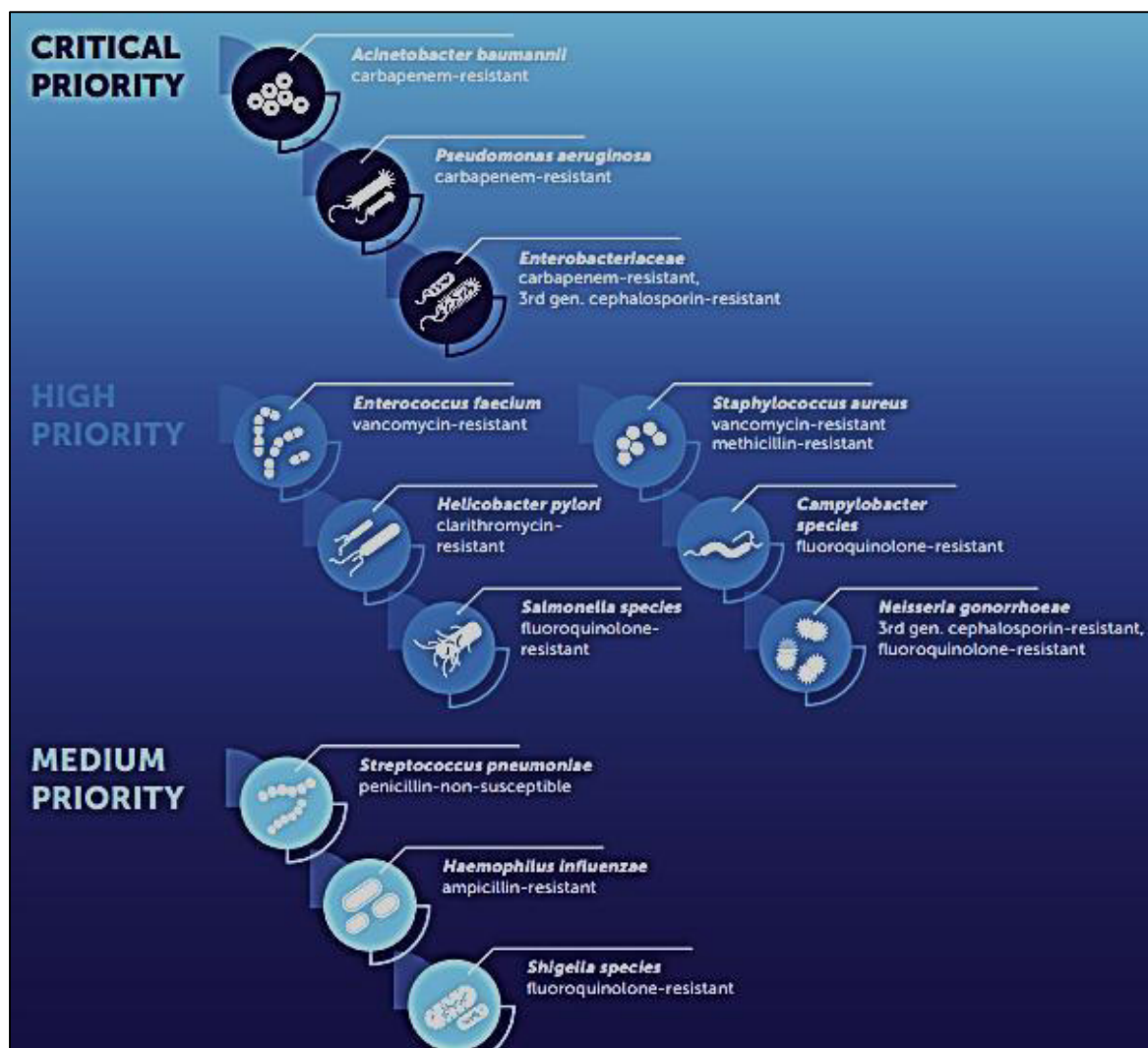


Figura 1. Prioridad de desarrollo e investigación de nuevos antibióticos

Fuente: WHO 2017 (27)

El grupo más crítico incluye bacterias multidrogo-resistentes que incluyen: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias *Enterobacteriaceae*. Estas representan una gran amenaza en hospitales, asilos, y entre pacientes que requieren dispositivos médicos como ventiladores y catéteres venosos, y pueden causar infecciones severas y a menudo mortales como infecciones del torrente sanguíneo y neumonía (26).

Las enfermedades infecciosas son, actualmente, la segunda causa de muerte en el mundo, la tercera en países desarrollados y la cuarta en Estados Unidos. En todo el mundo, mueren anualmente 17 millones de personas a causa de infecciones bacterianas. Las bacterias resistentes matan alrededor de 25 000 personas al año en Europa. Una de las causas de la resistencia antibiótica es el uso de antibióticos para promover el crecimiento animal y prevenir enfermedades en las grandes granjas (23,28).

En Estados Unidos, aproximadamente 2 millones de personas al año adquieren infecciones bacterianas resistentes a antibióticos, de los cuales 23 000 mueren a causa de éstas (29,30).

En cuanto a la investigación y desarrollo farmacéutico para desarrollar nuevos antibióticos que combatan las infecciones multidrogo-resistentes el resultado ha sido infructuoso (Figura 2). Por ejemplo, solo algunas clases de nuevas moléculas están actualmente en desarrollo. En los últimos 20 años, solo dos nuevas clases de antibióticos (lipopéptidos y oxazolidinonas), ambos contra bacterias Gram-positivas, han sido desarrolladas y aprobadas. El último antibiótico contra bacterias Gram-negativas fue descubierto en 1962 (27).

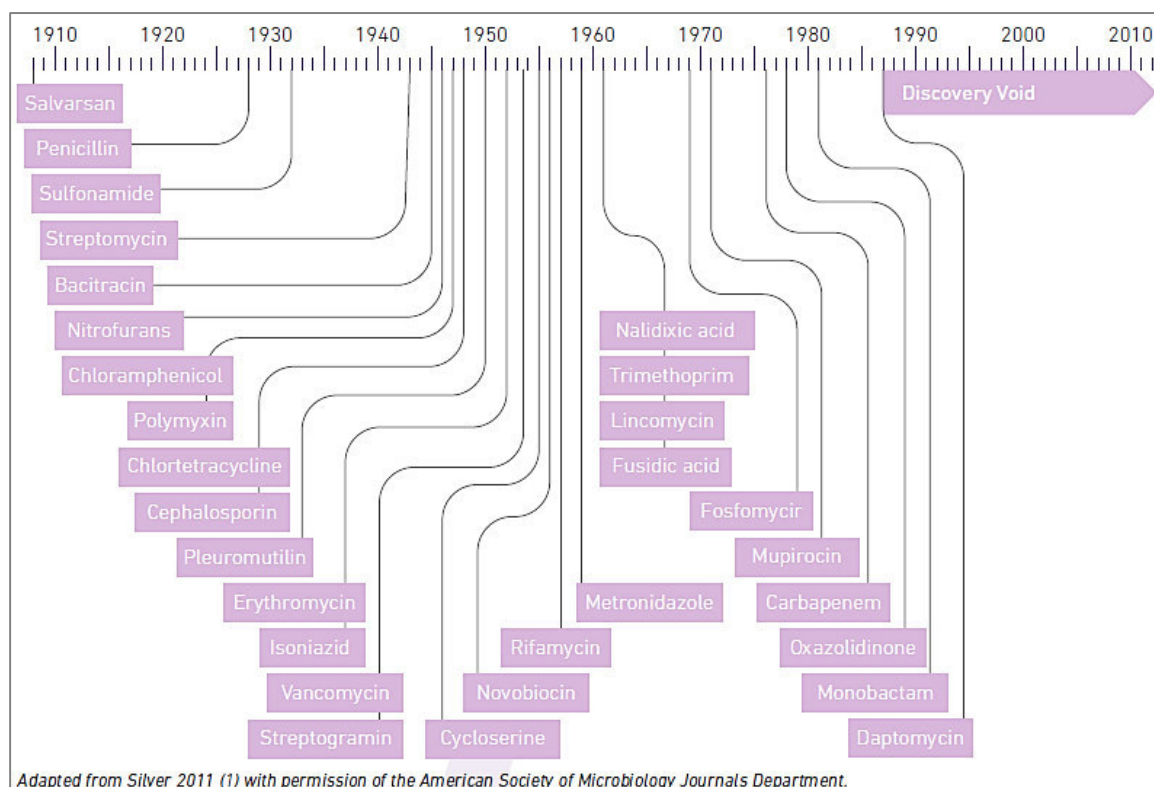


Figura 2. Fechas del descubrimiento de distintas clases de antibacterianos.
Ilustración del “Vacío de descubrimiento” (“Discovery void”). Las fechas indicadas
son aquellas en las que se reportó el descubrimiento inicial o patente.
Fuente: WHO 2014 (31)

Actualmente, de los 42 nuevos agentes terapéuticos en investigación para uso clínico, solo 12 muestran actividad contra las bacterias Gram-negativas de prioridad, y cinco de ellas, todas ellas agentes modificados de las clases antibióticas ya conocidas, han progresado a ensayos de fase III (27).

La pérdida de interés en la investigación y desarrollo de antibióticos en las últimas décadas se debe a dificultades en el desarrollo clínico y diversos factores científicos, regulatorios y económicos. Resulta muy difícil descubrir nuevas clases de antibióticos que sean altamente activas, que tengan propiedades farmacocinéticas aceptables y que sean razonablemente seguras. Uno de los principales desafíos de los

agentes modificados a partir de clases antiguas de antibióticos es el potencial rápido desarrollo de resistencia, incluyendo también el riesgo de resistencia a través del uso de otros antibióticos (27).

Mundialmente, la OMS estima que sólo el 50% de antibióticos son usados correctamente. De los 150 millones de prescripciones anuales de antibióticos en Estados Unidos, 50 millones no son necesarias, de acuerdo a un estudio del CDC en el 2016 (24).

En muchos países, los antibióticos pueden ser adquiridos sin receta médica en farmacias, tiendas de abarrotes y vendedores ambulantes.

Más del 60% de antimicrobianos en África y Asia es deficiente, además, la falsificación se ha apoderado de esta y otras regiones. Mundialmente se usa de 63 000 a 240 000 toneladas de antibióticos al año en la agricultura (24).

Los gastos de atención en salud (pública y privada) incrementarán en relación a las tasas crecientes de enfermedad. Se simulan dos tipos de escenarios (uno de baja y otro de alta resistencia antimicrobiana). Globalmente, en el peor de los casos (alta resistencia antimicrobiana), los gastos adicionales serían, para el 2050, 1.2 billones de dólares anuales; mientras que, en el mejor de los casos (baja resistencia antimicrobiana), serían 0.33 billones de dólares anuales (24).

Ya para el 2030, los gastos adicionales en atención médica incrementarían 0.22 billones de dólares al año, en el mejor escenario (24).

En los países de América Latina, las tasas de resistencia a los medicamentos antimicrobianos entre los patógenos bacterianos son altas. Los datos sobre estas tasas en Perú son incompletos y ninguna institución en el Perú ha participado en estudios de vigilancia multinacionales, sin embargo, la OMS a través de la Organización Panamericana de la Salud en 2009 realizó una evaluación de la situación respecto a la resistencia a los antimicrobianos, donde se encuentra que el perfil de resistencia de la *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes hospitalizados es elevado tanto para la Gentamicina (54,9%) como para la Ceftazidima (53,6%). Se observó niveles intermedios de resistencia para Piperacilina/Tazobactam, Amikacina, Aztreonam, Meropenem y Cefepima (5,32).

No se observó resistencia a la Colistina y Cefoperazona/sulbactam. La resistencia al Imipenem fue baja, 28,5%. Al comparar los perfiles de resistencia de los pacientes hospitalizados en servicios críticos con los perfiles de resistencia de los pacientes hospitalizados en servicios generales se observó mayores resistencias en UCI para el Aztreonam, Ceftazidima, Amikacina y Piperacilina (32).

Pseudomonas aeruginosa aislada en pacientes hospitalizados muestra altos niveles de resistencia a varios antibióticos con acción antipseudomonal. Es de particular preocupación la resistencia a carbapenemas; la resistencia a Meropenem es de 43.2%. Esta resistencia puede llegar a 55.9% en los aislamientos procedentes de pacientes de UCI (5,32).

b. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gramnegativa, no fermentadora, móvil, presente en casi cualquier ambiente (agua, suelo, diversas superficies, dispositivos médicos), con una gran habilidad de adaptación y versatilidad metabólica, pudiendo crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, a temperaturas de hasta 42°C y hacer uso de diferentes compuestos metabólicos, desde las moléculas más pequeñas hasta las más complejas (6,33).

Es un patógeno oportunista causante de diversas infecciones respiratorias, urinarias, gastrointestinales, dérmicas, oculares, óticas, entre otras, siendo estas, frecuentemente, de alta morbilidad y mortalidad. Sin embargo, este no afecta a personas inmunocompetentes y en ausencia de cualquier lesión, sino que afecta a pacientes con un sistema inmune debilitado, incluyendo adultos mayores, personas con SIDA, cáncer, fibrosis quística, quemaduras, úlceras, pacientes intubados en cuidados intensivos, postoperatorios o aquellos en tratamiento con inmunosupresores (6,7,33,34).

Pseudomonas aeruginosa era, entre el 2011 y el 2012, la causante de casi el 9% de infecciones y era el cuarto patógeno más común en hospitales de Europa, mientras que, en Estados Unidos, el 7.1% de las infecciones eran causadas por esta bacteria (35).

En el 2016, se encontró que *P. aeruginosa* era la segunda causa de infecciones hospitalarias en España y que representaba el 10.5% de estas infecciones. Esta prevalencia es mayor en áreas de cuidados intensivos, reportándose una prevalencia del 13% (35).

c. Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa tiene resistencia intrínseca a un numeroso grupo de antibióticos. La resistencia natural de este microorganismo se debe principalmente a la baja permeabilidad de la membrana externa, la expresión de bombas de eflujo y la producción de β -lactamasas inducibles por AMPc; sin embargo, su alta adaptabilidad debido a factores genéticos, incluyendo hipermutabilidad, le permite también desarrollar fácilmente gran virulencia y otros tipos de resistencia (7,35). En general, la adquisición de β -lactamasas transferibles resulta en la resistencia a imipenem, meropenem y todas las cefalosporinas; la impermeabilidad de la membrana externa (alteración de la porina *OprD*) genera resistencia a aminoglucósidos, imipenem y pérdida de la susceptibilidad del meropenem; y la sobreproducción de las bombas de eflujo *MexAB-OprM* y *MexXY-OprM* desencadenan resistencia a las fluoroquinolonas, macrólidos, aminoglicósidos, sulfonamidas, tetraciclinas y muchos β -lactámicos (5,8,36).

Otros mecanismos de resistencia incluyen la producción de enzimas y mutaciones de los receptores (por ejemplo, enzimas modificadores de aminoglicósidos o la metilación de nucleótidos específicos impidiendo la unión de aminoglicósidos a su receptor) (36).

Por otro lado, el uso prolongado, repetitivo o inadecuado de antibióticos de amplio espectro potencia la resistencia a los antibióticos conllevando a la multidrogo-resistencia, definida como la “no susceptibilidad a tres o más clases de antimicrobianos” (37). La terapia antibiótica puede inducir la expresión de genes mutantes no expresados de manera estable (36),

ya que *Pseudomonas aeruginosa* posee mecanismos multifactoriales de respuesta hacia los antibióticos (37).

En el caso de las β -lactamas, el imipenem parece elevar la expresión de genes codificadores de la biosíntesis de alginato, permitiendo la formación de biopelículas densas y robustas. Además, las bencilpenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas e imipenem son lábiles a la hidrólisis e inducen el gen del *ampC*, conllevando a la degradación del antibiótico. Por otro lado, la ceftazidima no induce dicho gen, pero si es un sustrato del AMPc, impactando en la transcripción de un gran número de genes en *P. aeruginosa*, causando una mutagénesis inducida y reduciendo la toxicidad del ciprofloxacino (33).

En cuanto a las fluoroquinolonas, varias bombas de eflujo cromosómicamente codificadas son capaces de reconocerlas. Además, *P. aeruginosa* responde transcripcionalmente, tanto a concentraciones inhibitorias como sub-inhibitorias de ciprofloxacino, induciendo o reprimiendo cientos de genes. Por ejemplo, las concentraciones inhibitorias de este crean una presión selectiva a favor de formas mutantes incrementando la expresión del gen de *ampC*, mientras que niveles inhibitorios de ciprofloxacino y ofloxacino incrementan la frecuencia de mutación para la resistencia de carbapenemas. Asimismo, se ha observado que, en presencia de concentraciones sub-inhibitorias de ciprofloxacino, tobramicina o tetraciclina, se incrementa la formación de biopelículas estáticas (33).

El sistema de eflujo, en este caso el MexXY, también genera resistencia a los aminoglicósidos, tetraciclinas y cloranfenicol, el cual es inducido

por concentraciones sub-inhedorias de estos, aunque, intrínsecamente, *P. aeruginosa* es resistente al cloranfenicol debido al sistema de eflujo MexAB-OprM. De igual manera, bajas concentraciones de macrólidos, como azitromicina, aunque muestran actividad bactericida contra biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, acentúan las formas mutantes generando una sobreexpresión de la bomba de eflujo Mex-CD-OprJ y una producción de β -lactamasas (33).

Tal como se ha descrito, la gran capacidad de respuesta de *P. aeruginosa* hacia diversos antibióticos resulta en el desarrollo de resistencia ya sea a los mismos antibióticos a los que ha sido expuesto como a una resistencia cruzada.

En Europa, un estudio realizado en el 2015 arrojó que el porcentaje promedio de cepas aisladas de *P. aeruginosa* resistentes a piperacilina/tazobactam, carbapenemas y fluoroquinolonas era cerca del 20%, mientras que las resistentes a ceftazidima y aminoglicósidos era 13%. Además, se encontró que su resistencia a piperacilina/tazobactam mostró una tendencia creciente entre el 2011 y el 2015 (35). Asimismo, el Reporte Anual sobre Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en Europa del 2016 informa que, entre el 2013 y el 2016, el 33.9 % de las cepas aisladas de *P. aeruginosa* eran resistentes a al menos un grupo antimicrobiano. Además, se reportó que el porcentaje promedio más alto de resistencia reportado en el 2016 fue de 16.3 % para piperacilina/tazobactam, seguido por las fluoroquinolonas (15.0 %), carbapenemas (15.0 %), ceftazidima (13.0 %) y aminoglucósidos (10.0%) (20).

En Latinoamérica, se ha encontrado que la probabilidad de hallar cepas de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos como carbapenemas, piperacilina/tazobactam y ciprofloxacino se ha duplicado desde 1997 hasta el 2001; así también, el porcentaje de cepas MDR pasó de ser 4.1% en 1997 a 17.1% en el 2001 (9). De igual manera, un estudio realizado en Brasil realizado entre enero del 2010 y diciembre del 2015 reportó que las tasas más altas de resistencia de *P. aeruginosa* fueron de 54.3 % para ciprofloxacino, 53.1 % para levofloxacino y 47 % para norfloxacino (38). Del mismo modo, en el 2011, un reporte del Programa Regional de Vigilancia de la Resistencia de Brasil indicó que las cepas recolectadas en 11 naciones de la región mostraban un alto porcentaje de resistencia a carbapenemas, siendo las tasas más elevadas las encontradas en Guatemala (75.8 %), Perú (62.5–68.8 %) y Ecuador (55.6 %) (39). En Argentina, se ha hallado que, hasta el 2011, el 20 % de los aislados de *P. aeruginosa* recuperados presentaban resistencia elevada a aminoglucósidos debido a impermeabilidad. Además, en la mayoría de los países latinoamericanos, la resistencia de las cepas de *P. aeruginosa* a fluoroquinolonas es muy alta debido a mutaciones de los genes que codifican los sistemas de eflujo, y la resistencia a ciprofloxacino sobrepasa el 70 % en algunos centros hospitalarios (8).

d. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos, son virus que infectan y se reproducen específicamente en bacterias en crecimiento, y consisten de material genético y proteínas (40–42).

Estos poseen diversas ventajas frente a los antibióticos, como lo son:

- Seguridad ecológica: Son inofensivos a humanos, plantas y animales.
- No se reportan efectos secundarios.
- Se replican en su sitio de infección.
- Producción relativamente sencilla, rápida y barata (43,44).
- Gran especificidad: No ataca a la flora normal del paciente, impidiendo infecciones secundarias en la cavidad oral, aparato digestivo, genitales, piel, conjuntiva y aparato urinario (45).

Los bacteriófagos son los entes biológicos más abundantes de la tierra, la comunidad científica los estima en una población global aproximada de 10^{30} bacteriófagos, y juegan un rol muy importante en el balance global de los ecosistemas bacterianos (40).

Se conocen más de 5100 bacteriófagos, todos ellos analizados por microscopía electrónica, el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV) reconoce un orden, 13 familias y 31 géneros de bacteriófagos (Tabla 1) (46).

Tabla 1. Clasificación y propiedades básicas de los bacteriófagos.

Simetría	Ácido nucleico	Orden y familia	Género	Miembros	Particulares
Binario (con cola)	ADN, ds, L	<i>Caudovirales</i>	15	4950	
		<i>Myoviridae</i>	6	1243	Cola contráctil
		<i>Siphoviridae</i>	6	3011	Cola larga, no contráctil
		<i>Podoviridae</i>	3	696	Cola corta
Poliédrico	ADN, ss, C ds, C, T ds, L	<i>Microviridae</i>	4	40	Cápside compleja, lípidos
		<i>Corticoviridae</i>	1	3?	Vesícula lipoproteica
		<i>Tectiviridae</i>	1	18	interna
	ARN, ss, L	<i>Leviviridae</i>	2	39	
	Ds, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	1	Envoltura lipídica
Helicoidal	ADN, ss, C	<i>Inoviridae</i>	2	57	Filamentos o barras
	ds, L	<i>Lipothrixciridae</i>	1	6?	Envoltura lipídica
	ds, L	<i>Rudoviridae</i>	1	2	Similar al virus del mosaico del tabaco
Pleomórficos	ADN, ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	6	Cubierta lipídica, si cápside
	Ds, C, T	<i>Fuselloviridae</i>	1	8?	Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón

L: lineal, C: circular, T: superhelicoidal, S: segmentada, ds: simple cadena, ss: doble cadena

Fuente: Calendar 2006 (46)

El genoma de los fagos puede componerse de ADN o ARN el cual puede ser de cadena doble o de una sola cadena (Figura 3). El material genético es protegido por una cubierta proteica denominada cápside (40). La estructura de los fagos es determinada por sus proteínas de envoltura (o proteínas estructurales) cuya función principal es la de proteger al material genético del fago, estas proteínas pueden además proveer al fago de: cuello, cola, fibras caudales, láminas basales y/o espículas (40,42).

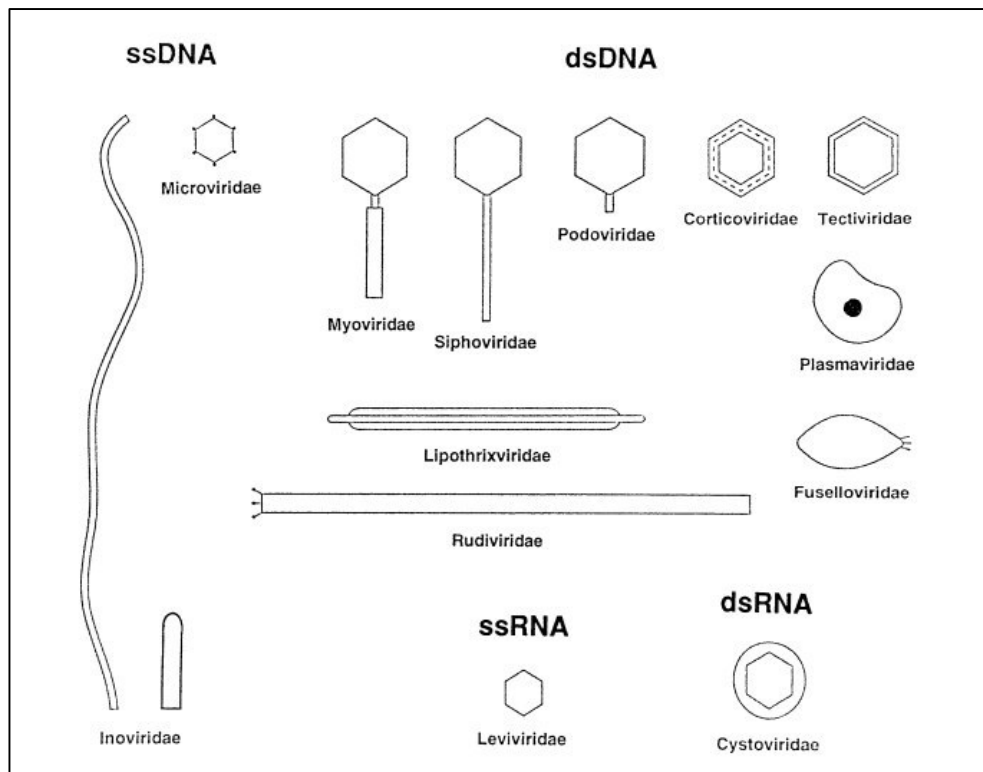


Figura 3. Representación gráfica de los principales grupos de fagos
Fuente: Segundo 2003 (42)

La forma en la que las proteínas se distribuyen alrededor del material genético del virus define la complejidad estructural y la forma de este, de tal modo que existen 4 formas básicas o simetrías: binaria (fagos que tienen una estructura de cabeza y cola), icosaédrica (también conocidos como cúbicos), helicoidal (filamentosos) y pleomórfica. Todos los bacteriófagos tienen una estructura de cabeza o cápside que varía en tamaño y forma. La mayoría tiene una estructura de cola de tamaño y longitudes variables. La estructura de la cola es un tubo helicoidal hueco. Al comienzo de la infección, el genoma de los bacteriófagos pasa a través de la cola a la bacteria huésped. La longitud de los bacteriófagos binarios varía de 17 a 500 kb y la longitud de sus colas oscila entre 10 y 800 nm (41,42).

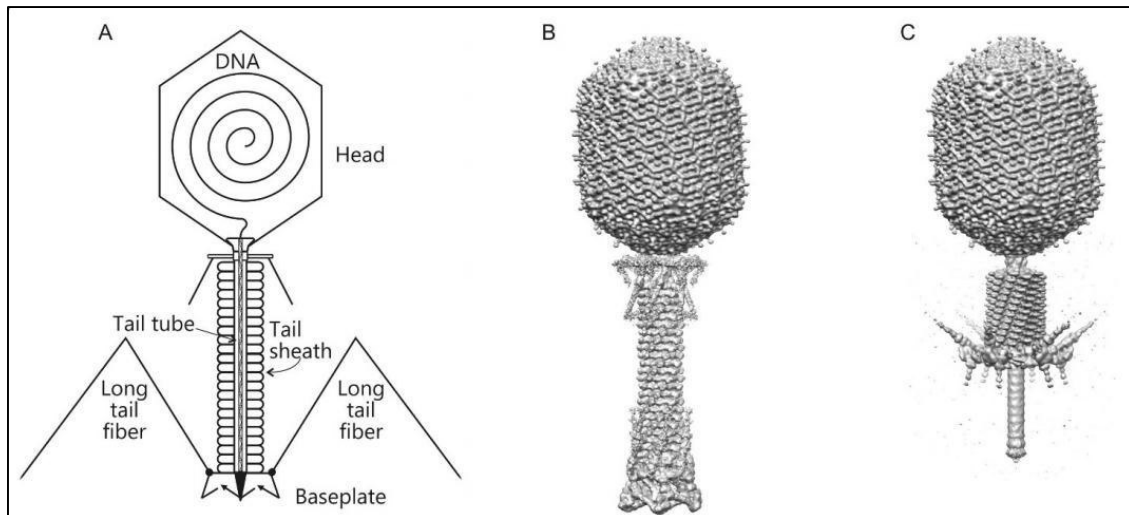


Figura 4. Estructura del bacteriófago T4

Fuente: Leiman et al 2010 (47)

Tres familias contienen virus envueltos. Aproximadamente en el 96% de los bacteriófagos hay un genoma de ADN bicatenario (dsADN). El 4% restante tiene genomas ssADN, ssARN y dsARN. Los genomas pueden codificar desde sólo 3 a 5 productos hasta 100. Los genomas de los bacteriófagos tienen bases poco frecuentes o modificadas que los protegen de la degradación por las nucleasas del huésped durante la infección. El grupo más famoso es el de los bacteriófagos Tipo T que se enumeran de T1 a T7. Los bacteriófagos individuales más conocidos son el T4 (Figura 4) y λ (41).

Mecanismos de replicación: Todos los fagos conocidos pueden dividirse en 2 grupos de acuerdo con el tipo de infección; un grupo es caracterizado por una infección lítica y el otro está representado por una infección lisogénica, o infección atemperada (48).

- Ciclo lítico (Figura 5 y 6): El crecimiento de los bacteriófagos puede ser diferenciado en pasos secuenciales: la colisión del fago con una bacteria susceptible de adsorción, la **adhesión** del virión, el ingreso

del **ácido nucleico** del virión, un periodo de **eclipse** donde se **sintetizan** las proteínas y el ácido nucleico del fago, un periodo **post-eclipse** durante el cual maduran los viriones, un paso de **liberación** de los viriones y un periodo de difusión de los viriones extracelulares que buscan adsorberse a otras bacterias (49).

El fago se replica en el interior de la bacteria y el proceso finaliza con la lisis del huésped inducida por el fago y la liberación de la progenie (41).

Los bacteriófagos se adsorben a las moléculas receptoras de la superficie de las células bacterianas durante el primer paso de la infección (**Adsorción**). Los receptores pueden ser pili, proteínas, oligosacáridos o lipopolisacáridos del huésped. Estructuras especializadas como las fibras de la cola median la adsorción. El bacteriófago T4 tiene cola y ancla las fibras de ésta en los receptores lipopolisacáridos de su huésped. Esto causa un cambio conformacional que lleva a la contracción de la vaina de la cola y a la penetración de la membrana celular y del bacteriófago. El ADN es luego inyectado en la célula del huésped a través del tubo de la cola (40,41,49).

Otros bacteriófagos pueden unirse a un segundo receptor. Los bacteriófagos que no tienen cola penetran en la bacteria huésped produciendo enzimas degradadoras de polisacáridos que digieren los componentes de la envoltura o pared celular bacteriana. Las bacterias desarrollan resistencia a la infección por bacteriófagos cuando los receptores de la célula huésped son alterados por una

mutación. La pérdida de algunos receptores no ofrece protección contra las infecciones por bacteriófagos que se unen a otros receptores del huésped (41,49).

El genoma del bacteriófago penetra en la célula huésped a través del tubo de la cola (**Inyección del ácido nucleico**). El bacteriófago T4 empaqueta lisozimas en la base de su cola de una infección previa y usa la enzima para degradar una porción del peptidoglucano de la pared celular bacteriana. El ADN ingresa en la célula mediante un proceso que no se conoce bien para la mayoría de los bacteriófagos. Una vez que está en el interior de la célula huésped, circulariza el ADN rápidamente por medio de las terminaciones o extremos adhesivos, o bien las terminaciones adhesivas, o las terminaciones lineales se modifican y quedan protegidas de las nucleasas bacterianas (41,49).

Tan pronto como el ADN genómico del bacteriófago entra en la célula, la ARN polimerasa del huésped reconoce a los promotores virales en el ADN y comienza la transcripción de los genes tempranos benignos, produciendo, por ejemplo, enzimas de reparación, proteínas desactivadoras de las proteasas del huésped y bloqueadoras de nucleasas. La traducción de estos genes está acoplada con la transcripción (**Replicación del genoma del bacteriófago**). Posteriormente, un conjunto de genes tardíos es transcrito y traducido, produciendo proteínas estructurales y lisozima. La lisozima es empaquetada en la cola de algunos bacteriófagos con el fin de iniciar una nueva infección. Una vez que todas las partes del

bacteriófago han sido producidas, se ensamblan las nuevas partículas (**Síntesis y ensamblaje de nuevas partículas fágicas**).

Una copia de ADN del fago se empaqueta o se enrolla en una cabeza icosaédrica preensamblada. La cola y las estructuras accesorias (como la placa basal y las fibras de la cola) se ensamblan y unas pocas moléculas de lisozima o una enzima comparable son empaquetadas en la placa basal de la cola (41,49).

La lisozima restante o la lisina del fago o las endolisinas, muramidasa o virolisinas en la célula permiten que el virus escape o se libere del huésped (**lisis bacteriana**). Estas enzimas hidrolizan uniones específicas en la mureína o en la capa de peptidoglucano de la pared celular. Otra enzima clave, la holina, es usada por los fagos para crear poros en la membrana interna de la célula huésped en el momento adecuado y permitir que la lisina o enzimas semejantes alcancen al peptidoglucano, lo cual facilita la lisis del huésped y la liberación del bacteriófago. Finalmente, la célula huésped es destruida por lisis celular, esta ruptura conlleva a la liberación de la progenie fágica, cuyo número producido por la infección se denomina ***burst size*** o tamaño de explosión (41,49).

El tiempo transcurrido desde la adsorción del fago a su bacteria huésped hasta el inicio de la liberación de la progenie por lisis bacteriana se denomina **periodo de latencia**. En el estudio del ciclo de vida de los bacteriófagos se consideran a la adsorción del fago y al tamaño de explosión o “*burst size*” como parámetros críticos y específicos para la caracterización de los fagos (49).

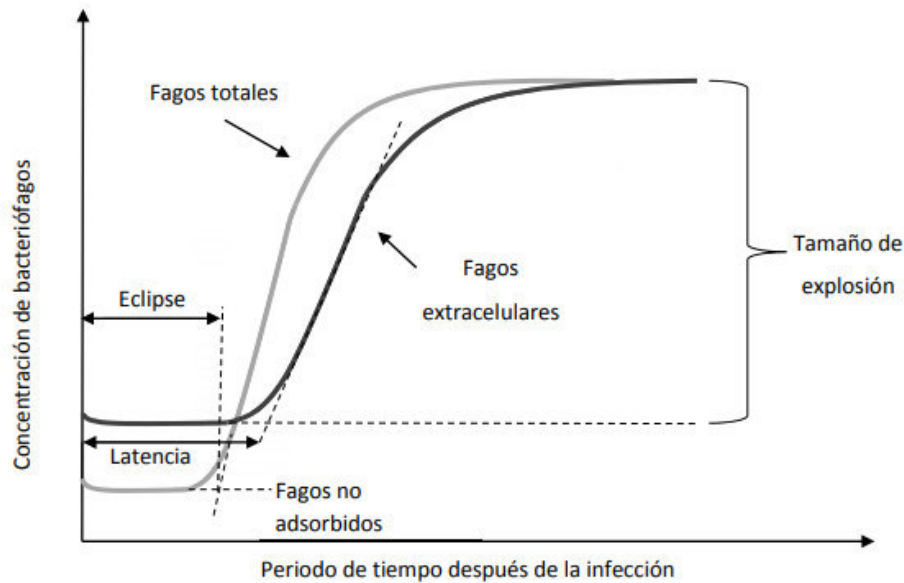


Figura 5. Fases del ciclo líticos de los bacteriófagos

Fuente: Spricigo 2011 (50)

- Ciclo lisogénico (Figura 6): el ADN del fago se replica en el interior de la célula, pero no hay liberación de viriones, y la bacteria huésped se mantiene viable (40).

Los bacteriófagos lisogénicos o atemperados infectan a sus huéspedes, aunque en lugar de matarlo durante una infección lítica, integran su genoma en una región específica de su cromosoma. Después de la penetración, el ADN viral se integra en el cromosoma y se replica cada vez que la célula copia su ADN cromosómico durante la división celular. Cuando el genoma del fago se integra en un sitio en el cromosoma bacteriano, se lo denomina profago. Algunos bacteriófagos atemperados codifican transposasas, las cuales permiten que el fago se inserte aleatoriamente en el cromosoma. Otros bacteriófagos se integran en localizaciones específicas dentro del cromosoma. Durante el estado de profago, todos los genes del bacteriófago están reprimidos, excepto el gen que

codifica una proteína represora. La proteína represora impide la síntesis de enzimas y proteínas requeridas para el ciclo lítico (41).

Si el represor se torna inactivo (pierde su función), el ADN viral es eliminado del cromosoma bacteriano. El ADN separado (genoma del bacteriófago) actúa como un virus lítico capaz de producir nuevas partículas virales que se liberan durante la lisis celular. Esta desrepresión o inducción espontánea se produce una vez cada 10000 divisiones celulares, aproximadamente. Los bacteriófagos atemperados pueden portar genes del huésped de una bacteria a otra en un proceso que se llama transducción (41).

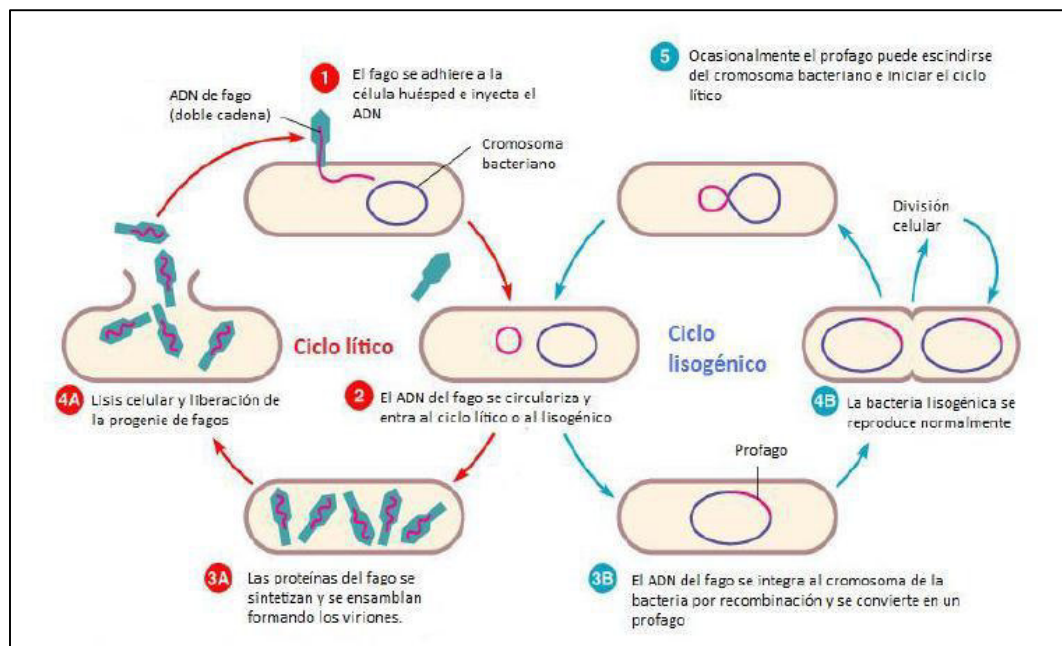


Figura 6. Esquema de los ciclos lítico y lisogénico (correspondiente al fago λ)
Fuente: Tortora et. al 2010 (51)

e. Técnicas de enumeración e identificación de bacteriófagos

- Técnica de la doble capa: es la técnica más común de determinación de concentración de partículas fágicas infecciosas, en esta técnica diluciones de las preparaciones de fagos son mezclados con una bacteria huésped permisiva y dispersados en un medio sólido.

Durante la incubación, la bacteria huésped forma un lecho en el medio sólido excepto donde las partículas fágicas infecciosas lisan o inhiben el crecimiento de las células, resultando en una zona clara o traslúcida denominada como “placa”. Así, la unidad de fago infeccioso es denominada una unidad formadora de placa (UFP) (49).

- Microscopía electrónica de transmisión (MET): la microscopía electrónica se ha vuelto una base importante de la Virología comparativa y de su clasificación, y están disponibles actualmente numerosas técnicas de microscopía electrónica. De manera general la microscopía electrónica puede ser considerada como una gran cámara y las micrografías electrónicas son a menudo el único registro permanente de una investigación. La transmisión electrónica incluye la tinción negativa y positiva de las partículas virales aisladas, una selección fina, contraste, inmunomicroscopía electrónica, crio microscopía electrónica con reconstrucción de imagen tridimensional, digestión de partículas enzimáticas entre otros (49).

La tinción negativa, una técnica de extrema simplicidad, es de importancia universal en la virología. Esta permite una instantánea comparación, clasificación e identificación de virus, incluso hasta niveles más específicos que solo especies. El principio de la tinción negativa es mezclar partículas y una solución de electrones de una sal metálica de peso molecular alto y tamaño molecular pequeño, dentro de la cual las partículas son embebidas. Los tintes usados en la investigación de fagos incluyen: tungstatos (fosfotungstato de sodio y potasio, tungstato de litio, silico-tungstato de sodio), sales de

uranilo (acetato, formato, acetato de magnesio, nitrato, oxalato), molibdato de amonio y vanadio, y ácido molíbdico. Los tintes más comúnmente usados son: fosfotungstato y acetato de uranilo (49).

Por otro lado, la microscopía electrónica para fagos es un proceso de varios pasos que son: purificación de las partículas del fago, tinción, observación, fotografía, control del aumento y medición e interpretación (49).

- Microscopía de Epifluorescencia: La microscopía de Epifluorescencia puede ser un método rápido y preciso para determinar la abundancia de bacteriófagos tanto de cultivos como de muestras ambientales. El conteo de partículas virales con este método requiere que los virus sean recolectados en un filtro con tamaño de poro pequeño y teñidos con un colorante fluorescente, éste es estimulado por una luz a una longitud de onda específica. Dicho colorante emite luz a una mayor longitud de onda cuando se une a ácidos nucleicos. La luz resulta en una partícula brillante más grande que el tamaño real de las partículas del virus, permitiendo que los virus sean contados a un aumento menor que cuando no están teñidos (49).
- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR): Esta técnica permite de forma rápida y efectiva identificar la presencia de bacteriófagos o los genes codificados por fagos de muestras ambientales, células bacterianas o virus purificados. El primer paso del PCR es obtener un modelo adecuado de alta calidad a partir del cual amplificar los genes. Afortunadamente, en la mayoría de los casos, el PCR requiere

poca cantidad de ADN, sin embargo, existen casos en que podría requerir mayor cantidad de este, por ejemplo secuenciación (52).

IV. HIPOTESIS

Las muestras de agua de los ríos Rímac, Chillón y Lurín de la provincia de Lima - Perú contienen bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo – resistente.

V. PARTE EXPERIMENTAL

A. Tipo y diseño de Investigación

El estudio fue observacional descriptivo.

B. Línea de Investigación

Microorganismos y parásitos emergentes y reemergentes.

C. Materiales y medios

Medios y reactivos

- Agar agar
- Agar Mueller-Hinton (MH) (Merck)
- Agar Tripticasa de Soya (TSA) (Merck)
- Agua destilada
- Caldo MH Merck
- Caldo Tripticasa de Soya (TSB) (Merck)
- Cloroformo Merck
- Cloruro de calcio
- Glicerol
- Solución salina 0.9 %

Materiales y equipos

- Asa de Kolle
- Baño de agua
- Baño de hielo
- Botellas asépticas
- Centrífuga Hettich Zentrifugen Rotofix 32A

- Crioviales
- Espectrofotómetro Thermo Spectronic Génesys 20
- Filtro tipo jeringa con tamaño de poro de 0,22 μm
- Hisopos estériles
- Incubadora de cultivo Incucell MMM
- Matraces Erlenmeyer
- Micropipeta Eppendorff con rango de 100 μL a 1000 μL
- Micropipeta Eppendorff con rango de 20 μL a 50 μL
- Micropipeta Eppendorff de 10 μL
- Papel filtro
- Placa Petri (Petri)
- Tips amarillos
- Tips azules
- Tubos de ensayo 12 x 75 mm
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm con tapa
- Tubos para centrifuga

D. Metodología

a. Obtención de cepas bacterianas

Las bacterias huéspedes (*Pseudomonas aeruginosa*) fueron obtenidas del Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, las cuales provenían de los cultivos realizados a diferentes pacientes. Las cepas se conservaron en crioviales con TSB y glicerol al 20% a una temperatura de aproximadamente - 4°C. Se obtuvo un total de 5 cepas.

b. Perfil de sensibilidad de las cepas bacterianas

El perfil de sensibilidad se realizó mediante la técnica de disco-difusión descrita por Kirby - Bauer con modificaciones (53).

Se preparó el inóculo tomando con un asa metálica la superficie de colonias bien aisladas de aspecto similar de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en placa de agar TSA incubada por 24 horas. El inóculo se transfirió a un tubo con 4 a 5 mL de solución salina hasta alcanzar la turbidez de un estándar control de la escala McFarland 0.5. Posteriormente, se sumergió un hisopo de algodón no tóxico, estéril, dentro de la suspensión del inóculo y se rotó varias veces con una presión firme sobre las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido.

Se sembró sobre la superficie seca de una Petri de agar Mueller – Hinton, estriando el hisopo tres veces sobre toda la superficie del agar, haciendo rotar la Petri aproximadamente 60° cada vez. Para finalizar, se pasó el hisopo por la superficie del borde del agar. Luego se colocó la tapa de la Petri, se dejó secar por 3 a 5 minutos. Se colocaron, utilizando pinzas y/o aplicadores multidiscos, los discos impregnados en los siguientes antimicrobianos: Ciprofloxacino 5 µg, Gentamicina 10 µg, Cefepime 30 µg, Meropenem 10 µg, Aztreonam 30 µg, Colistina 10 µg, Ceftazidima 30 µg, Amikacina 30 µg, Norfloxacin 30 µg, Tobramicina 10 µg y Piperacilina 100 µg. Se presionaron con suavidad cada disco sobre la superficie del agar. Cada disco se colocó de manera tal que la distancia entre cada centro de difusión no sea menor de 24 mm. Se invirtieron las Petris y se incubaron a 35°C durante 24 horas (53).

c. Obtención de muestras de agua

Las muestras de aguas residuales se obtuvieron en el mes de junio del 2016 de los ríos Rímac (altura del Puente Morales Duárez, aproximadamente en el punto medio del cauce del río), Chillón (altura del Km 23 de la Panamericana Norte, aproximadamente en el punto medio del cauce del río) y Lurín (altura del Puente Lurín, en la ribera del río), las cuales constituían las fuentes de bacteriófagos. En cada caso, se recolectó 1 L de muestra en recipientes estériles y cada muestra fue enfrentada a las 5 cepas, para obtener un total de 15 lisados.

d. Aislamiento de bacteriófagos por enriquecimiento

El aislamiento de bacteriófagos se realizó según el método de enriquecimiento descrito por Van Twest y Kropinski con modificaciones (49).

Se filtró la muestra de agua con papel filtro. Se añadió 50 mL de la muestra filtrada a 50 mL de TSB doblemente concentrado y suplementado con 5 mM de CaCl_2 , el cuál contenía una cepa bacteriana en fase exponencial cultivada en el mismo tipo de medio. Luego de 24 horas de incubación a 37°C, se filtró nuevamente con papel filtro y se centrifugó a 1500 RPM por 10 minutos. El sobrenadante se filtró con filtro tipo jeringa de tamaño de poro de 0,22 μm directamente sobre un vial estéril, el cual se mantuvo refrigerado aproximadamente a 4°C.

El procedimiento se repitió con las 3 muestras de agua y las 5 cepas bacterianas.

e. Determinación de la presencia de bacteriófagos por Prueba de la Gota (Spot test)

Se determinó la presencia de bacteriófagos líticos para *Pseudomonas aeruginosa* a través de la Prueba de la gota o Spot test descrita por Van Twest y Kropinski con modificaciones (49).

Se inoculó la bacteria huésped, conservada en criovial, en TSB y se incubó por 24 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo, se sembró por agotamiento en agar MH y se incubó nuevamente por el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. Luego, las colonias aisladas se reconstituyeron en solución salina hasta escala McFarland 0.5 y se diseminó la bacteria huésped, con un hisopo estéril, en la superficie de Petris con TSA suplementado con 5 mM de CaCl₂ y se incubó hasta su fase exponencial a 37°C. Transcurrido el tiempo necesario, se añadió una gota de filtrado y se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones por 24 horas. Se realizó el mismo procedimiento sólo con el medio de cultivo para control. Luego de la incubación, se verificaron las placas en búsqueda de zonas de lisis, las cuales evidencian la presencia de bacteriófagos líticos para la bacteria huésped.

El procedimiento se realizó con cada filtrado obtenido en el paso anterior.

f. Cuantificación (o Enumeración) de bacteriófagos: Técnica de doble capa

La enumeración de bacteriófagos se realizó mediante la Técnica de Doble Capa descrita por Kropinski y colaboradores con modificaciones (49).

Para ello, primero se preparó los medios *Overlay* y *Underlay*.

Overlay

- Preparar el caldo MH, añadiendo agar hasta una concentración de 4 – 6 g/L
- Calentar hasta derretir el agar (para el caso de *overlay* suplementado, añadir CaCl_2 1M hasta la concentración deseada)
- Dispensar volúmenes de 3 ml en tubos de ensayo 13 x 100 mm, tapar, esterilizar por calor, almacenar a 4°C hasta su uso.
- Para su uso, calentar los tubos con *overlay* a 46 – 48 °C en Baño de agua.

Underlay

- Preparar el agar MH. Esterilizar por calor.
- Dejar enfriar hasta los 55 – 60 °C y añadir CaCl_2 1M estéril hasta la concentración final deseada. Mantener el medio en 48 – 50°C.
- Dispensar 18 - 25 ml de medio por Petri estéril; cuando enfríe, empaquetar y almacenar a 4°C hasta su uso.

Luego se preparó una batería de 9 tubos 12 x 75 mm estériles enumerados del 10^{-1} al 10^{-9} y se agregó 900 μL de TSB a cada uno. Se añadió 100 μL de un lisado al primer tubo. Se mezcló, se cambió de tip y se transfirió 100 μL al siguiente tubo. Se repitió la secuencia hasta llegar al último tubo y usando un nuevo tip en cada transferencia. De esta manera se obtuvieron diluciones seriadas del 10^{-1} al 10^{-9} .

A un tubo con *overlay* suplementado con 5 mM de CaCl_2 (*overlay*), mantenido a 50°C, se transfirió 100 μL de la dilución seleccionada de bacteriófagos y 100 μL de la cepa bacteriana en fase exponencial. El contenido del tubo se vertió en una Petri con *underlay* suplementado con

5 mM de CaCl₂. Luego de que el agar se solidificó, se incubó por 24 horas a 37 °C. Transcurrido dicho tiempo, se realizó el conteo de las áreas de lisis (placas) respectivas y se aplicó la fórmula correspondiente para hallar el título de bacteriófagos.

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{Número de placas (UFP)} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de dilución (mL)}}$$

Dónde, UFP significa unidades formadoras de placas siendo ésta la unidad de medida del recuento de bacteriófagos.

El procedimiento se repitió con cada filtrado positivo para la prueba de la gota.

g. Purificación de bacteriófagos

La purificación de bacteriófagos se realizó mediante la técnica descrita por Van Twest y Kropinski con modificaciones (49).

Se tomó una placa de lisis bien aislada y se resuspendió en 1 mL de TSB. Se dispersó esta suspensión, por el método de agotamiento, en una Petri con TSA suplementado con 5 mM de CaCl₂. Una vez seco, se vertió un *overlay* conteniendo la bacteria huésped en fase exponencial, empezando desde la parte más diluida hasta la más concentrada. Se incubó por 16 horas a 37°C y las placas se resuspendieron en 1 mL de TSB con 10 µL de cloroformo. Luego de homogenizar la mezcla, se almacenaron a 4°C.

h. Caracterización parcial de bacteriófagos

- **Cinética de los bacteriófagos: Curva de crecimiento de un solo paso**

La cinética de los lisados de bacteriófagos se realizó mediante la Curva de un solo paso, descrita por Hyman y Abedon y modificaciones (49).

A un tubo con 100 μL de un lisado de bacteriófagos con un título aproximado de 10^5 UFP/mL mantenido a 37°C en Baño de agua, se añadió 100 μL de la bacteria huésped en fase exponencial ($\text{OD}_{650\text{nm}}$: 0,1 - 0,2). Luego de incubarlo por 6 minutos a 37°C en Baño de agua, se transfirió 100 μL de esta mezcla a un tubo con 10 mL de TSB suplementado con 5 mM de CaCl_2 a la misma temperatura y se mantuvo en Baño de agua durante todo el proceso. De esta última mezcla, se transfirió 100 μL a un tubo con 900 μL de TSB suplementado con 5 mM de CaCl_2 , se añadió 10 gotas de cloroformo, se homogenizó y se procedió al método de la doble capa con la bacteria huésped - éste correspondió al tiempo inicial (t_0). Asimismo, luego de 5 minutos, se tomó otra muestra de 100 μL y se procedió de la misma forma. Se repitió el procedimiento cada 5 minutos por un periodo de una hora y se realizaron los recuentos respectivos.

Los datos obtenidos se plasmaron en un gráfico semi-logarítmico de tiempo (min) vs número de placas (UFP). A partir de éste, se hallaron el periodo de latencia y el tamaño de explosión de cada lisado seleccionado.

- **Constante de adsorción**

Se seleccionaron los lisados que desarrollaron placas mejor aisladas y se halló su constante de adsorción mediante la técnica descrita por Kropinski (49).

Se preparó una batería de 12 tubos 12 x 75 mm estériles listados de A1 hasta A10, C1 y C2 con 950 µL de TSB suplementado con 5 mM de CaCl₂ y 3 gotas de cloroformo grado reactivo y se mantuvieron en Baño de hielo por 10 minutos. Por otro lado, en un matraz (C) se colocó 9 mL de TSB suplementado con 5 mM de CaCl₂, y en otro matraz (A), 9 mL de un cultivo de la célula huésped en fase exponencial cultivada en el mismo tipo de medio (OD_{650nm}: 0,1 - 0,2). Luego de mantener ambos matraces a 37°C en Baño de agua por 5 minutos, se añadió 1 mL del lisado de bacteriófagos de título aproximado de 10⁵ UFP/mL. Luego de 1 minuto más a 37°C en Baño de agua, se tomó 50 µL del contenido del matraz A y se transfirió al primero de los tubos; se agitó vigorosamente por 10 segundos y se colocó nuevamente en el Baño de hielo. Se tomaron muestras de 50 µL cada minuto por 10 minutos y se repitió el proceso (A1 – A10). De la misma manera, se transfirió 50 µL del contenido del matraz C a los dos tubos restantes y se procedió igualmente (C1 y C2). A partir de cada tubo, se procedió a la técnica de la doble capa con la bacteria huésped y se realizaron los recuentos respectivos.

La constante de adsorción se halló mediante la siguiente fórmula:

$$k = \frac{2,3}{Bt} \log \frac{P_0}{P}$$

Donde: k es la constante de velocidad de adsorción, en mL/min; B es la concentración de las células bacterianas; t es el intervalo de tiempo en el cual el título de fagos cae de P_0 (inicial) a P (final).

- **Efecto del cloruro de calcio (CaCl_2) en la adsorción de los bacteriófagos**

Se seleccionaron 4 lisados que desarrollaron placas más claras y mejor aisladas para comparar la constante de adsorción obtenida en medio suplementado y no suplementado con CaCl_2 .

Se procedió tal cual el procedimiento anterior; sin embargo, en esta ocasión se utilizó medio sin suplementar en cada paso. Se calculó la constante de adsorción para cada caso y se comparó.

- **Efecto de la temperatura en el título de los bacteriófagos**

Se seleccionaron los 4 lisados que desarrollaron placas más claras y mejor aisladas para medir el efecto de la temperatura en el título de los lisados de bacteriófagos.

Se colocó un tubo con 250 μL de lisado con un título aproximado de 10^8 UFP/mL a 10^{10} UFP/mL en Baño de agua a una temperatura determinada. Luego de 5 minutos, se tomó 100 μL del contenido, se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-9} y se procedió por el método de doble capa. Se repitió el procedimiento a los 15, 30 y 60 minutos, usando temperaturas de 50°C , 60°C , 70°C y 80°C .

Se realizó el recuento respectivo para hallar el título en cada caso.

VI. RESULTADOS

A. Perfil de sensibilidad de las cepas bacterianas

Los resultados del perfil de sensibilidad se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Perfil de sensibilidad de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibióticos	Cepa 1 (C1)	Cepa 2 (C2)	Cepa 3 (C3)	Cepa 4 (C4)	Cepa 5 (C5)
Ciprofloxacino 5µg	18 mm I	18 mm I	19 mm I	16 mm I	18 mm I
Gentamicina 10µg	11 mm R	15 mm S	16 mm S	11 mm R	14 mm I
Cefepime 30µg	13 mm R	13.5 mm R	17 mm I	11 mm R	16 mm I
Meropenem 10µg	8 mm R	10 mm R	20 mm S	24 mm S	17 mm I
Aztreonam 30µg	11 mm R	13 mm R	13 mm R	6 mm R	13 mm R
Colistina 10µg	7 mm R	10 mm R	10 mm R	11 mm S	10 mm R
Ceftazidima 30µg	21 mm S	23 mm S	24 mm S	29 mm S	22 mm S
Amikacina 30µg	20 mm S	21 mm S	23 mm S	21 mm S	20 mm S
Norfloxacino 30µg	16 mm I	16 mm I	28 mm S	36 mm S	23 mm S
Tobramicina 10µg	19 mm S	20 mm S	22 mm S	22 mm S	19 mm S
Piperacilina 100µg	21 mm S	21 mm S	25 mm S	29 mm S	24 mm S

R: Resistente, I: Intermedio, S: Sensible al antibiótico respectivo.

B. Aislamiento y determinación de la presencia de bacteriófagos: Prueba de la Gota (Spot test)

Mediante el método de aislamiento por enriquecimiento se obtuvieron 15 filtrados al enfrentar cada muestra de agua (provenientes de los ríos Rímac, Chillón y Lurín) con las 5 cepas bacterianas. De estos 15 filtrados, sólo 10 mostraron un resultado positivo en la Prueba de la gota (Figura 7), los cuales correspondieron a los obtenidos de los ríos Rímac y Chillón, confirmándose la presencia de bacteriófagos para *Pseudomonas aeruginosa*. Estos fueron codificados tal como se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3. Codificación de los lisados positivos para la prueba de la gota.

Codificación	Fuente	Bacteria huésped
LR1	Río Rímac	Cepa 1 (Ps1)
LR2	Río Rímac	Cepa 2 (Ps2)
LR3	Río Rímac	Cepa 3 (Ps3)
LR4	Río Rímac	Cepa 4 (Ps4)
LR5	Río Rímac	Cepa 5 (Ps5)
LC1	Río Chillón	Cepa 1 (Ps1)
LC2	Río Chillón	Cepa 2 (Ps2)
LC3	Río Chillón	Cepa 3 (Ps3)
LC4	Río Chillón	Cepa 4 (Ps4)
LC5	Río Chillón	Cepa 5 (Ps5)

LR: Lisados obtenidos a partir de muestra del río Rímac. LC: Lisados obtenidos a partir de muestra del río Chillón

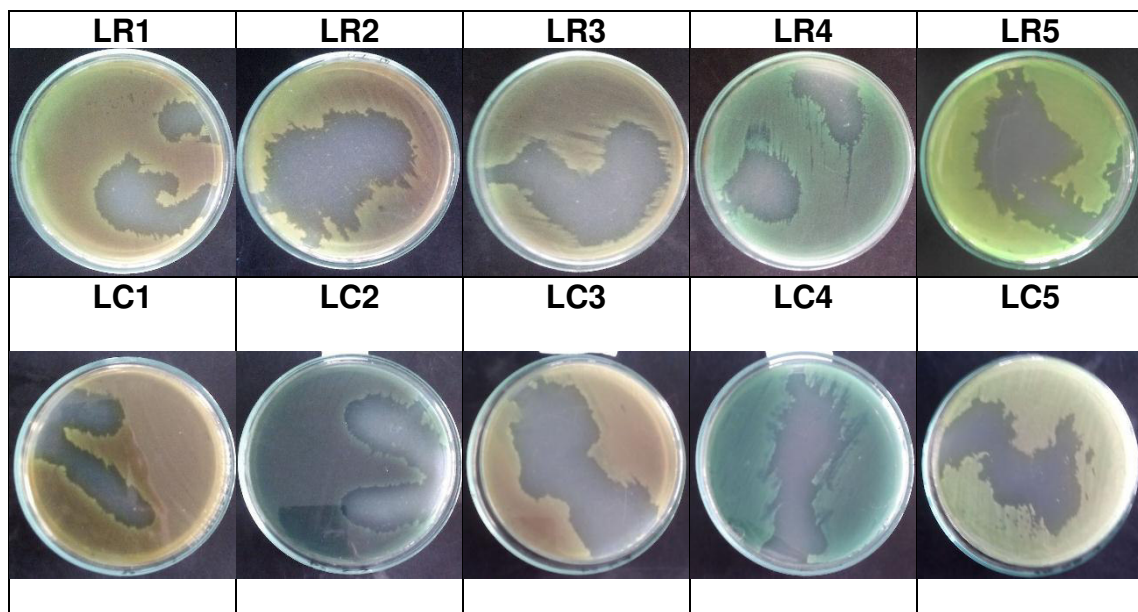


Figura 7. Prueba de la gota de los 10 filtrados con resultado positivo

C. Cuantificación de bacteriófagos: Técnica de doble capa

Mediante la técnica de doble capa (Figura 8), se obtuvo el título de los 10 lisados que contenían bacteriófagos para *Pseudomonas aeruginosa*, los cuales se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Título obtenido de cada lisado de bacteriófagos

Lisados		Título (UFP/mL)
LISADOS RÍO RÍMAC	LR1	2.3×10^{11}
	LR2	3.2×10^{11}
	LR3	3.6×10^{12}
	LR4	3.4×10^4
	LR5	6.5×10^6
LISADOS RÍO CHILLÓN	LC1	9.0×10^9
	LC2	1.34×10^6
	LC3	3.5×10^{11}
	LC4	2.7×10^9
	LC5	2.85×10^6

UFP/mL: Unidad formadora de placa por mililitro de lisado.

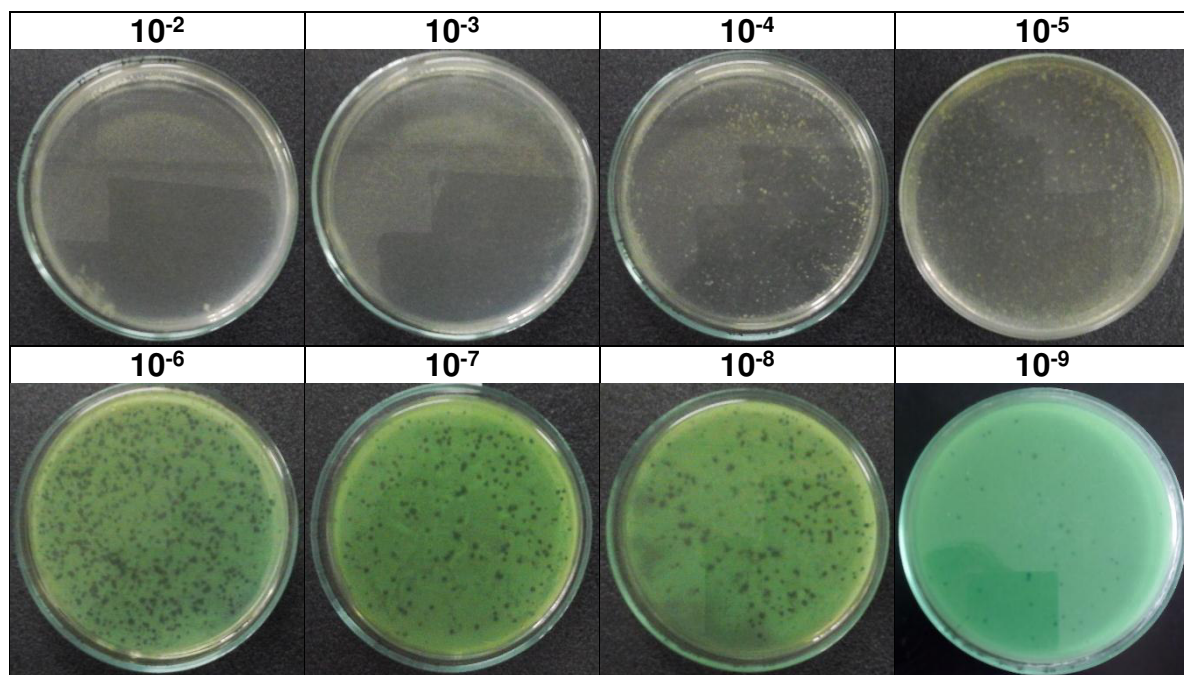


Figura 8. Enumeración de bacteriófagos por Técnica de Doble capa del LR1

D. Cinética de los bacteriófagos: Curva de crecimiento de un solo paso

Mediante las curvas de un solo paso, graficadas en las Figuras 9 y 10, se determinaron los periodos de latencia y el “tamaño de explosión” (*burst size*) de los lisados LR1, LR2, LR3, LR5, LC1, LC2, LC3, LC4 y LC5, cuyos valores se muestran en la Tabla 5.

La cinética del lisado LR4 no pudo obtenerse debido a que formó placas difusas y poco aisladas; lo cual impidió su recuento.

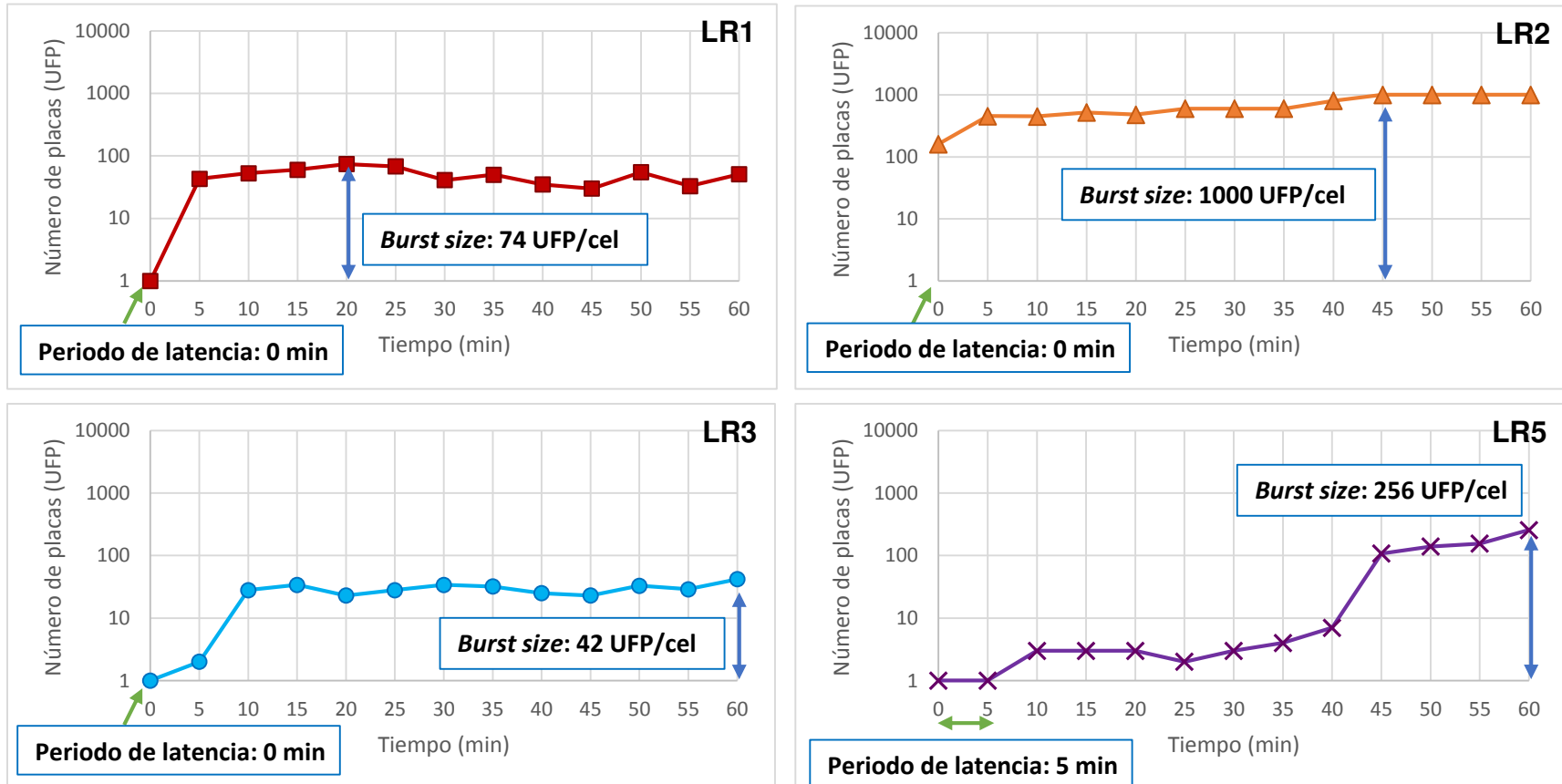


Figura 9. Curvas de un solo paso de los lisados seleccionados

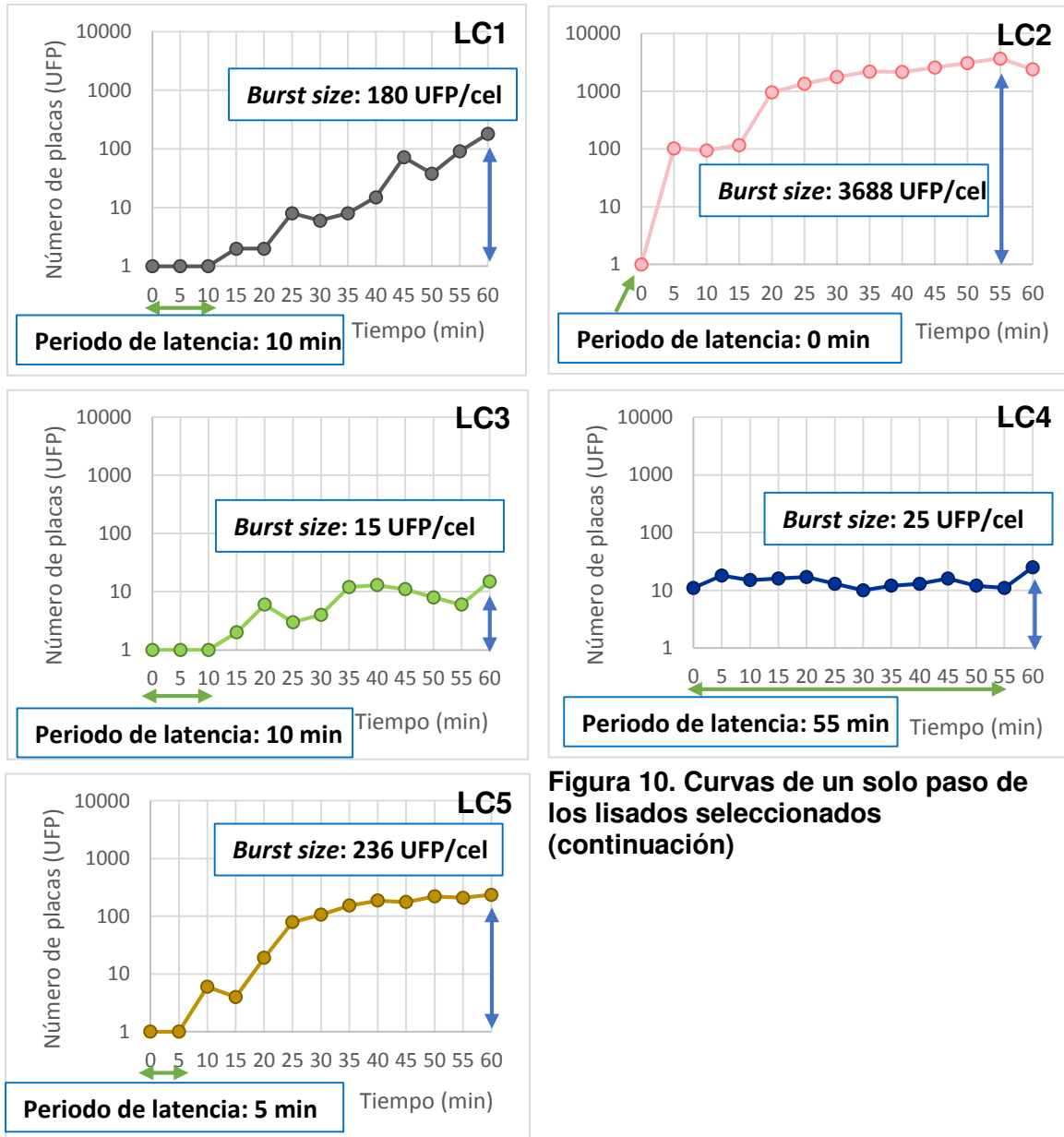


Figura 10. Curvas de un solo paso de los lisados seleccionados (continuación)

Tabla 5. Valores del periodo de latencia y tamaño de explosión de los lisados seleccionados.

	LR1	LR2	LR3	LR5	LC1	LC2	LC3	LC4	LC5
Periodo de latencia	0	0	0	5	10	0	10	55	5
Tamaño de explosión	74	1000	42	256	180	3688	15	25	236

Donde: Periodo de latencia está expresado en min, Tamaño de explosión está expresado en UFP/célula

E. Constante de adsorción

Se obtuvieron las constantes de adsorción de los lisados LR1, LR2, LR3, LR4, LR5, LC1 y LC3, cuyos valores se muestran en la Tabla 6 y cuya gráfica se presenta en la Figura 11.

Tabla 6. Constantes de adsorción de los lisados seleccionados.

	LR1	LR2	LR3	LR4	LR5	LC1	LC2
K (mL/min)	$2,54 \times 10^{-9}$	$4,85 \times 10^{-9}$	$3,54 \times 10^{-9}$	$1,32 \times 10^{-8}$	$1,91 \times 10^{-9}$	$3,64 \times 10^{-9}$	$3,97 \times 10^{-9}$

K: Constante de adsorción de bacteriófagos.

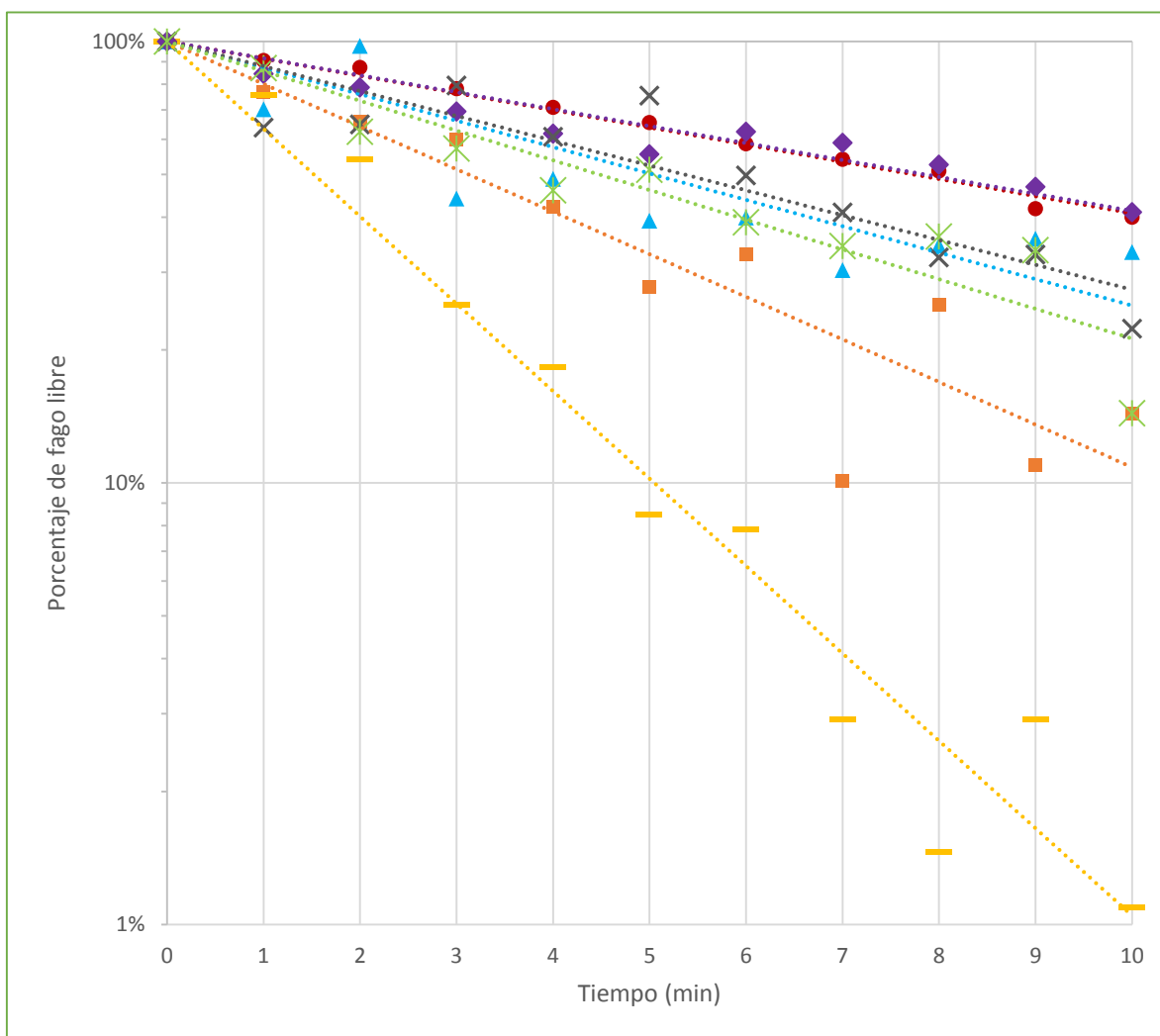


Figura 11. Perfil de adsorción de los lisados seleccionados. • LR1, ■ LR2, ▲ LR3, — LR4, ♦ LR5, x LC1, ✕ LC3.

En la Figura 12 se presenta, como ejemplo, los resultados del Ensayo de Adsorción del lisado LC1.

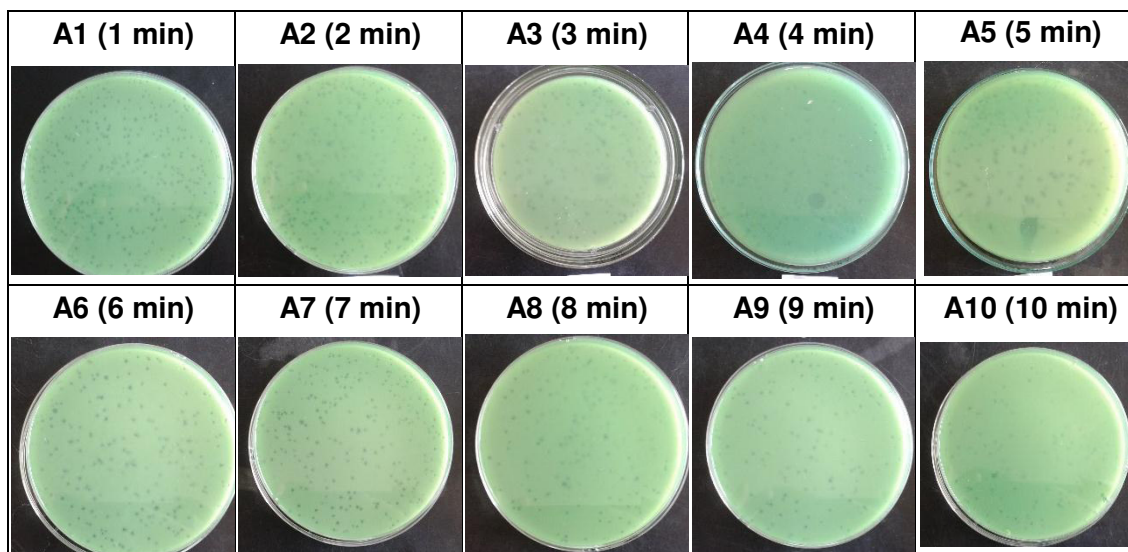


Figura 12. Ensayo de adsorción del lisado LC1

F. Efecto del cloruro de calcio en la adsorción de los bacteriófagos

Para comparar el efecto de los iones metálicos divalentes en el perfil de adsorción de los bacteriófagos, se seleccionaron los lisados LC1, LC3, LR2 y LR3 por haber presentado las placas más claras y mejor aisladas a comparación de los otros lisados. Se obtuvieron las constantes de adsorción de los lisados sin la presencia de CaCl_2 de los lisados LR2, LR3 y LC3, las cuales se presentan en la Tabla 7 y se grafican en la Figura 13. Así también, el efecto del CaCl_2 en las constantes de adsorción puede observarse de manera más clara en las gráficas presentadas en la Figura 14.

La constante de adsorción del lisado LC1 no pudo calcularse debido a que, en este caso, se obtuvo un número muy elevado de placas, lo cual impidió un recuento confiable.

Tabla 7. Comparación de las constantes de adsorción de los lisados seleccionados en presencia de cloruro de calcio versus las constantes de adsorción de los mismos en ausencia de éste.

Lisado	K (mL/min) En presencia de CaCl ₂	K (mL/min) En ausencia de CaCl ₂
LC1	$3,64 \times 10^{-09}$	incontable
LC3	$3,97 \times 10^{-09}$	$3,41 \times 10^{-09}$
LR2	$4,85 \times 10^{-09}$	$2,21 \times 10^{-09}$
LR3	$3,54 \times 10^{-09}$	$7,72 \times 10^{-09}$

K=Constante de adsorción de bacteriófagos.

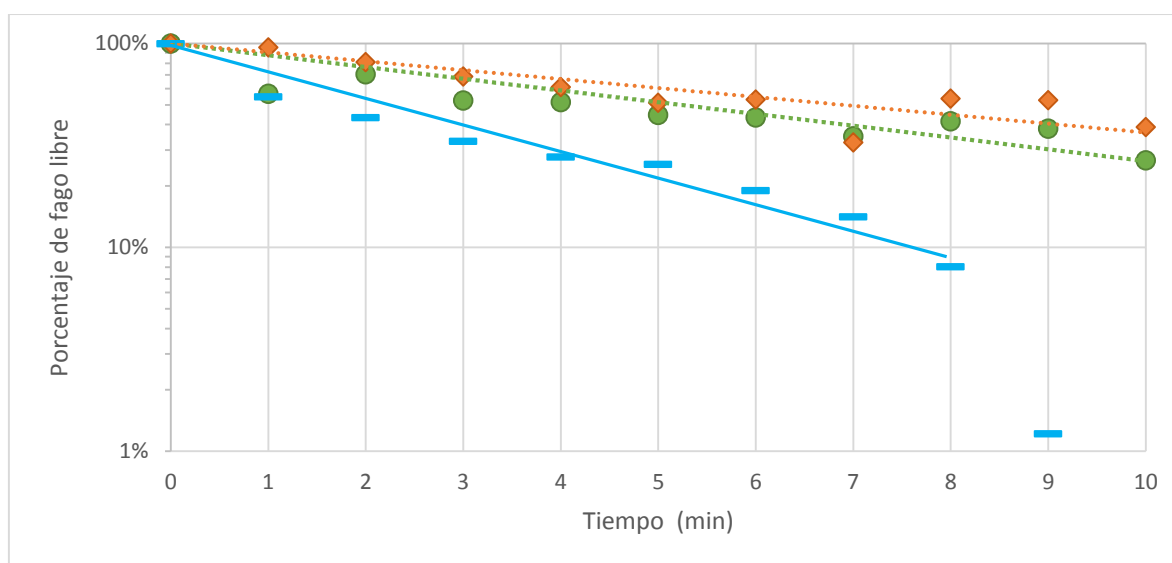


Figura 13. Perfil de adsorción de los lisados seleccionados en ausencia de iones metálicos divalentes. • LC3, ♦ LR2, — LR3

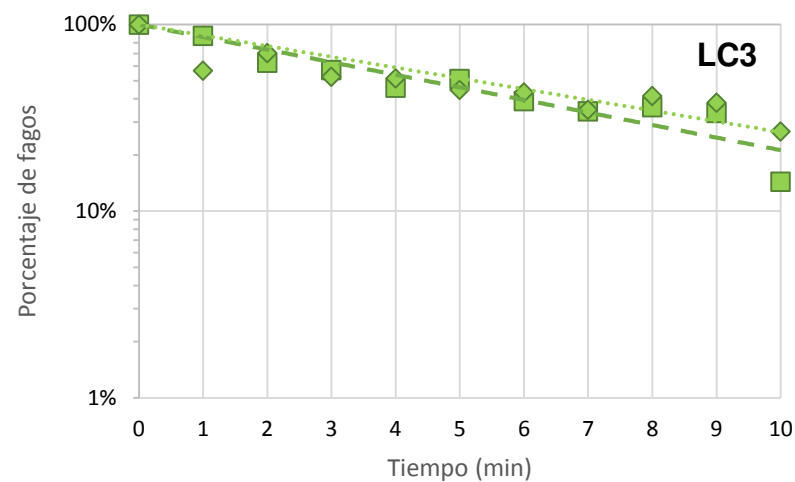
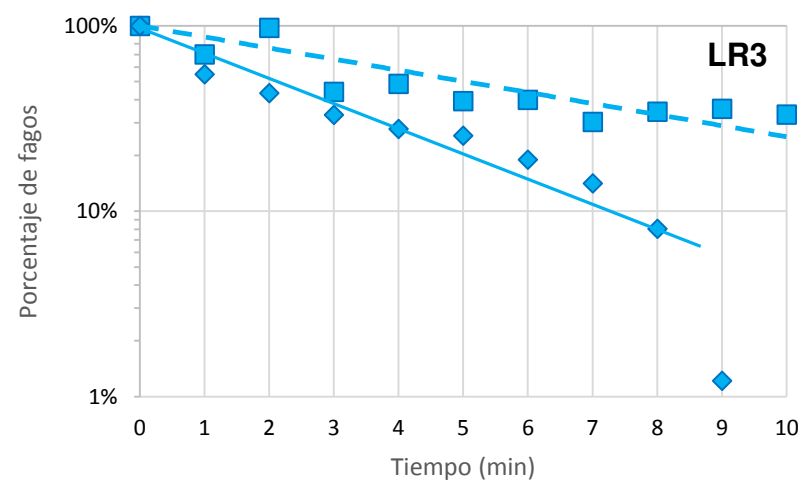
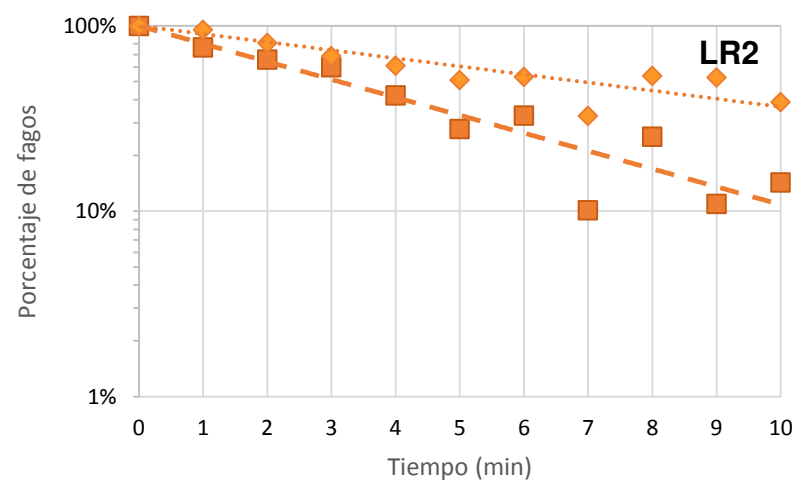


Figura 14. Comparación de los perfiles de adsorción de los lisados seleccionados en presencia y ausencia de CaCl₂. ~■~ En presencia de iones, ...♦... En ausencia de iones

G. Efecto de la temperatura en el título de los bacteriófagos

Para evaluar el efecto de la temperatura en la disminución del título de fagos, se seleccionaron nuevamente los lisados LC1, LC3, LR2 y LR3. Los resultados se grafican en la Figura 15.

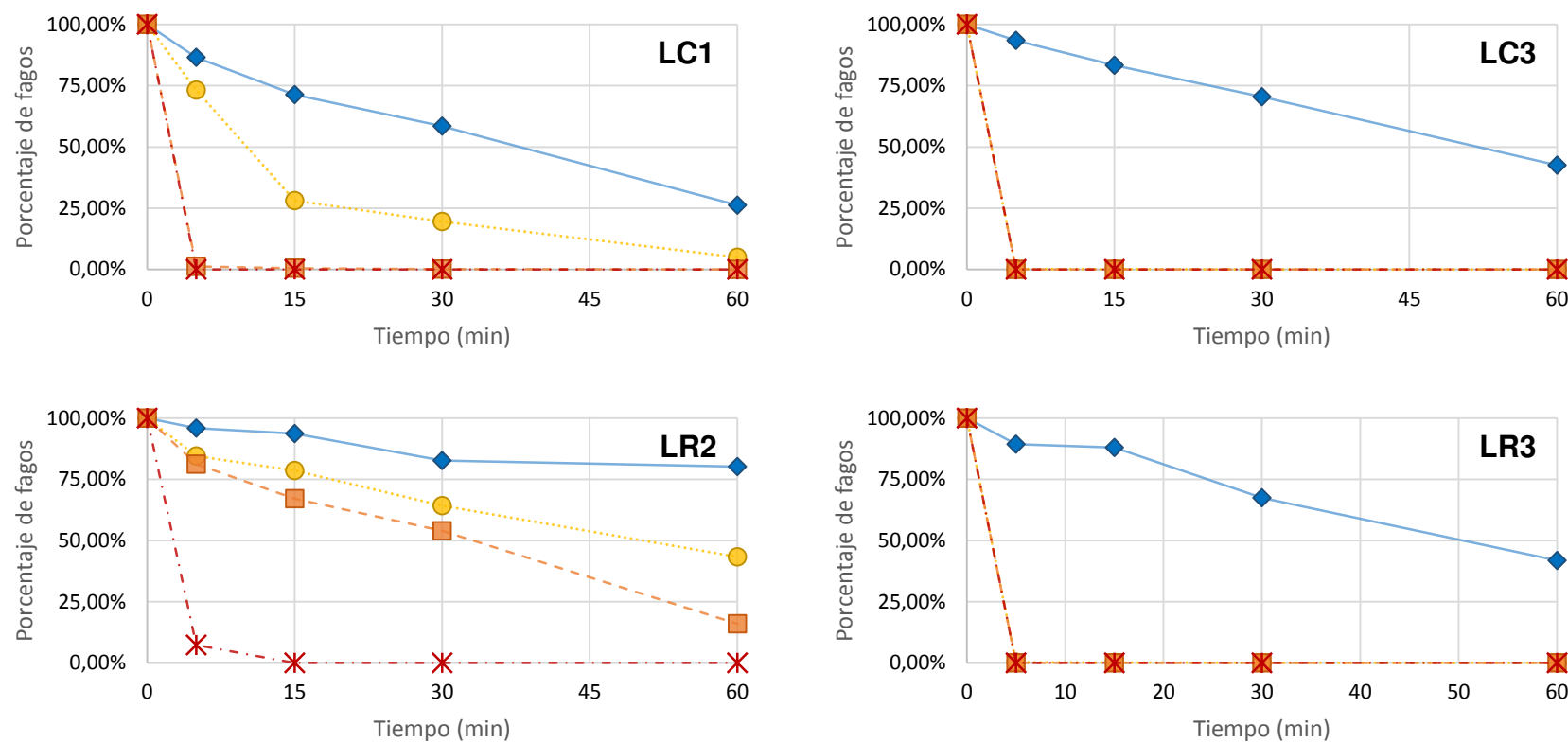


Figura 15. Efecto de la temperatura en el título de bacteriófagos. ♦ 50°C, ● 60°C, ■ 70°C, ✕ 80°C

VII. DISCUSIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa patógena oportunista considerada por la OMS dentro del grupo crítico de bacterias multidrogo-resistentes que amenazan globalmente a la salud pública, priorizando la investigación contra cepas que sean resistentes al grupo de carbapenemas (26,27). A partir de lo mencionado surge nuestra investigación, cuyo objetivo principal fue aislar bacteriófagos contra cepas multidrogo-resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* que podrían ser usados como posibles tratamientos ante infecciones producidas por esta bacteria.

Una bacteria es considerada multidrogo-resistente cuando es “no sensible” (resistente o intermedio) a tres o más grupos de antibióticos considerados efectivos contra dicha bacteria. Todas las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas como huésped de los fagos aislados en nuestra investigación, provenientes del Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM), cumplen con el perfil de resistencia anteriormente mencionado, y dos de ellas son resistentes al grupo de carbapenemas, siendo relevante la investigación de nuevas terapias contra las mencionadas cepas (29,54).

Con respecto a las tres posibles fuentes de bacteriófagos elegidos para el aislamiento de estos (Ríos Rímac, Chillón y Lurín), fueron elegidos para nuestro estudio por su importancia hidrológica para la provincia de Lima, de tal manera, estos pertenecen a las tres principales cuencas hidrográficas de la provincia y de tal manera constituyen las principales fuentes de abastecimiento de agua de la misma, además de formar parte

de la red de desagüe y alcantarillado; por lo expuesto la importancia para nuestro estudio radica en el creciente aumento del índice de contaminación de los mencionados ríos en los últimos años, criterio de elección para elegirlos como fuentes para el aislamiento de fagos contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo-resistente (55–59).

Los resultados obtenidos a partir de las fuentes descritas dieron positivo para dos de ellas: muestras de aguas de los ríos Rímac y Chillón, de los cuales se obtuvieron 10 lisados activos contra *Pseudomonas aeruginosa*, cada uno de ellos con diferentes títulos de fagos. En el caso de la muestra del río Lurín, no se obtuvieron lisados activos contra las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, probablemente debido a la ausencia de esta en dicha fuente de agua; por lo tanto, al no existir el huésped específico, tampoco existe la posibilidad de desarrollo de fagos contra esta bacteria.

Los lisados de los fagos fueron caracterizados de acuerdo con sus parámetros cinéticos, siendo los dos primeros el tiempo de latencia y el “*burst size*” o tamaño de explosión. Estos parámetros son los puntos más relevantes en el estudio del ciclo de vida de los bacteriófagos (49). En nuestro estudio, los lisados LR1, LR2, LR3 y LC2 mostraron un periodo de latencia de 0 minutos, y un “*burst size*” de 74, 1000, 42 y 3688 UFP/célula respectivamente; los lisados LR5 y LC5 mostraron un periodo de latencia de 5 minutos y un “*burst size*” de 256 y 236 UFP/célula respectivamente; los lisados LC1 y LC3 evidenciaron un periodo de latencia de 10 minutos y un “*burst size*” de 180 y 15 UFP/célula respectivamente; y el LC4, un periodo de latencia de 55 minutos con un

“*burst size*” de 25 UFP/célula. Estos resultados podrían ser comparados con otros estudios. En el caso de Didamony y col. se determinó los periodos de latencia de los fagos ϕ PSZ1 y ϕ PSZ2, los cuales fueron de 12 y 10 minutos respectivamente, y en cuanto al “*burst size*” fue de 100 UFP/célula en ambos fagos (18). En el estudio de Karumidze y col. los dos bacteriófagos caracterizados mostraron un periodo de latencia de 20 minutos, y un “*burst size*” de 130 y 210 UPF/célula (15); Cao y col. en su estudio determinaron que el periodo de latencia de un fago denominado PPA-ABTNL fue de 25 minutos y el “*burst size*” de 115 UFP/célula (17).

Estudios señalan que el tiempo de latencia está determinado por el tiempo que tarda el fago en encontrar a su huésped (tiempo de búsqueda), la calidad del huésped, la cantidad del huésped (densidad) y el complejo holina-endolisina; además tiempos de latencia más largos están asociados a tamaños de explosión más grandes, y tiempos de latencia más cortos se asocian a menores tiempos de generación lo que conlleva a explosiones más rápidas (60–63).

La fisiología del huésped (calidad) y la cantidad del mismo en el ambiente (densidad), influyen de manera directa en el tiempo de latencia, es decir huéspedes abundantes y de alta calidad resultarán en tiempos de latencia más cortos, ya que los fagos podrán encontrar bacterias más rápidamente (tiempo de búsqueda corto) y tendrán mejores recursos para llevar a cabo su ciclo lítico. Varios autores coinciden en señalar que los fagos pueden alcanzar un crecimiento más rápido de sus poblaciones reduciendo su tiempo de latencia, aunque esto esté asociado a tamaños de explosión más pequeños. Sin embargo, esto resulta ventajoso solo cuando las

densidades bacterianas son grandes. Cuando las densidades bacterianas son pequeñas, convendrán tiempos de latencia prolongados y por ende tamaños de explosión grandes, debido a que mientras más pequeñas sean las densidades bacterianas, estas serán más valiosas para el fago por lo que resultará más efectivo producir mayor progenie por célula infectada (60–62).

Por otro lado, el complejo proteico holina-endolisina media la lisis de la bacteria huésped. Las holinas son pequeñas proteínas de membrana que se acumulan hasta que la membrana se permeabilice para las endolisinas, que son enzimas muralíticas que degradan la pared celular de las células bacterianas. Luego de dicha permeabilización se produce la inmediata destrucción de la mureína y la explosión de la célula bacteriana. El tiempo que tarda la holina en permeabilizar la membrana está programado por genes específicos, por lo que modificaciones genéticas a estos niveles repercutirán en el tiempo de lisis (tiempo de latencia) (63).

Nuestros resultados evidencian, para los lisados LR2, LR5, LC2 y LC5, cortos periodos de latencia, pero también grandes tamaños de explosión, las cuales son características deseables en los fagos para ser considerados potenciales agentes terapéuticos, ya que al producirse más partículas virales a partir de un centro infectivo y en un corto tiempo, aumentan las posibilidades de controlar mejor las poblaciones bacterianas (60,64).

La determinación de la tasa de adsorción es fundamental para los estudios de la ecología de los fagos, para estimar el impacto de los bacteriófagos en las poblaciones bacterianas (49). La constante de adsorción es otro de

los parámetros de los fagos evaluados; en nuestro estudio se obtuvieron para el lisado LR1 una constante de adsorción de $2,54 \times 10^{-9}$ mL/min; para el lisado LR2, $4,85 \times 10^{-9}$ mL/min; para el lisado LR3, $3,54 \times 10^{-9}$ mL/min; para el lisado LR4, $1,32 \times 10^{-8}$ mL/min; para el lisado LR5, $1,91 \times 10^{-9}$ mL/min; para el lisado LC1, $3,64 \times 10^{-9}$ mL/min y para el lisado LC2, $3,97 \times 10^{-9}$ mL/min. En estudios realizados por Karumidze y col. los dos bacteriófagos caracterizados tuvieron una constante de adsorción de $2,7 \times 10^{-8}$ mL/min y $3,0 \times 10^{-8}$ mL/min (15).

La adsorción del fago a su huésped es el primer paso de la infección, esto se logra por el reconocimiento de receptores en la superficie de la célula huésped mediante las fibras de la cola, la adhesión de proteínas y otros varios apéndices. Este paso depende de un gran número de factores, que influyen en las tasas de adsorción del fago a su huésped, entre ellos: temperatura, tamaño de las células, densidad del huésped y densidad de los receptores de superficie (46,55).

La influencia de la temperatura en la adsorción variará de acuerdo al tipo de fago de manera individual; y en el caso de los tres últimos factores mencionados, influyen de manera proporcional en la tasa de adsorción ya que mientras se encuentren disponibles más receptores será más fácil y rápido para el fago encontrar y adherirse a su célula huésped (62,65).

Nuestros resultados son consistentes a los comparados en los estudios citados mostrando eficientes tasas de adsorción, siendo otra característica adecuada para un potencial uso en fagoterapia.

Otro factor que influye en la tasa de adsorción es la presencia de sales (particularmente iones divalentes), es por eso que se analizó el efecto del

ión calcio (en forma de cloruro de calcio) en la adsorción de nuestros fagos a la bacteria huésped (49). En nuestro estudio, se logró comparar el efecto de la presencia del ión calcio en la adsorción de los bacteriófagos en los lisados: LR2, LR3 y LC3.

En el caso del lisado LR2, el valor de la tasa de adsorción disminuyó de $4,85 \times 10^{-9}$ mL/min a $2,21 \times 10^{-9}$ mL/min; en el caso del lisado LR3, esta tasa aumentó de $3,54 \times 10^{-9}$ mL/min a $7,72 \times 10^{-9}$ mL/min; mientras que en el caso del lisado LC3, esta relación es difícil de discernir ya que los valores de las constantes de adsorción tanto en presencia como en ausencia del Ca^{+2} son muy cercanos: $3,97 \times 10^{-9}$ mL/min y $3,41 \times 10^{-9}$ mL/min. Según la literatura científica, la presencia de Ca^{+2} u otros iones divalentes (como el Mg^{+2}) estabilizaría al ADN enrollado en el interior de la cápside del fago, mejoraría en forma visible la tasa de adsorción y controlaría la penetración eficiente del ADN en el interior de la bacteria (66); así también la presencia del Ca^{+2} , al facilitar la adsorción de algunos fagos, podría generar un aumento en el número de bacterias infectadas y por lo tanto una mayor cantidad de progenie de fagos (40). Sin embargo, es requerido realizar mayores estudios enfocados en este parámetro, para establecer la relación real entre la presencia de iones divalentes y las tasas de adsorción de los bacteriófagos.

Por otro lado, cabe mencionar que se ha demostrado que las preparaciones de fagos no son siempre homogéneas con respecto a sus propiedades de adsorción, ya que algunos ensayos han revelado que existen subfracciones que se adsorben a una velocidad distinta (49), como

es el caso del lisado LR3 el cual muestra una fracción en la cual existe una adsorción más rápida.

El último parámetro evaluado en nuestros fagos fue la resistencia a diferentes temperaturas, este es importante en fagos considerados para uso terapéutico ya que ellos deben demostrar baja susceptibilidad a fluctuaciones de temperatura, debido a las diversas condiciones que se pueden presentar al transportar y almacenar las preparaciones de fagos, así también estos no deben ser afectados por las condiciones fisiológicas humanas normales (37°C) o en estados febriles por casos de infección, además nos permite saber a qué temperaturas los podemos someter durante algún proceso de fabricación de productos hechos a base de bacteriófagos (15,16,18,19).

En nuestra investigación se evaluó la estabilidad térmica de los fagos de los lisados LR2, LR3, LC1 y LC3 a los 50°C, 60°C, 70°C y 80°C. Se obtuvo que para el caso del lisado LR2, a 50°C el título de fagos disminuyó solo en un 19,88% luego de 60 minutos de exposición, a 60°C y 70°C luego de 30 minutos de exposición el título disminuyó en un 35,86% y 46,11% respectivamente, mientras que a 80°C el título de fagos sufrió una caída de aproximadamente 93% en los primeros 5 minutos. Para el lisado LC1, a 50°C el título de fagos disminuyó en un 41,46% luego de 30 minutos de exposición y en un 73,78% luego de 60 minutos de exposición, a 60°C en los primeros 15 minutos el título cayó en un 71,95%, mientras que a 70°C y 80°C los fagos fueron inactivados completamente en los primeros 5 minutos. En el caso de los lisados LR3 y LC3, a 50°C el título de fagos disminuyó en un 32,62% y 29,57% respectivamente en los primeros 30

minutos, en 58,16% y 57,53% respectivamente luego de 60 minutos de exposición. A 60°C, 70°C y 80°C, los fagos fueron inactivados completamente en los primeros 5 minutos.

En comparación con nuestro estudio, el título de los fagos caracterizados por Karumidze y col. disminuyó en un 50% luego de 5 horas a 60°C y luego de 45 min a 70°C (15). En el caso del estudio de Didamony y col. sus bacteriófagos estudiados se redujeron en 27% luego de 60 minutos expuestos a 56°C, en un 80% luego de 15 minutos expuestos a 60°C y fueron completamente inactivados luego de 60 minutos a la mencionada temperatura (18).

En el estudio de Alsaffar y Jarallah se obtuvo que el Phage1 fue disminuyendo continuamente a temperaturas de 50°C a más (19).

Tal como se ha descrito líneas arriba, la temperatura es un parámetro que afecta la estabilidad de los fagos, en este caso, a mayor temperatura de exposición, la disminución del título del fago fue mayor, mientras que a temperaturas cercanas a los 37°C (temperatura corporal) el título del fago se mantuvo constante por el periodo de tiempo evaluado. La manera en que influye la temperatura en la sobrevivencia de los fagos es muy variable, las características de los fagos en ese aspecto son altamente diversificadas y pueden diferir no solo entre familias sino también entre los mismos miembros de éstas, en otras palabras, la influencia que ejerce la temperatura en la estabilidad puede variar de un fago a otro dependiendo, por ejemplo, de las condiciones características del hábitat de cada fago o de su estructura (65,67).

La disminución del título de los fagos obtenidos en este estudio podría explicarse por una posible desnaturalización y/o degradación de sus proteínas, enzimas y material genético debido a las altas temperaturas. Se conoce que el aumento de temperatura afecta de manera compleja principalmente los enlaces de hidrógeno de las proteínas, provocando una pérdida en la estructura y función de ésta. De igual manera, el calor produce la desnaturalización del material genético, por ejemplo, en los ADN y ARN de doble cadena, el calor rompe los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases y el apilamiento de las bases, provocando el desenrollamiento de la doble hélice. Asimismo, la literatura indica que un ARN de doble cadena es más estable a altas temperaturas que un ADN de doble cadena de secuencia equivalente (68,69).

Realizando una comparación de los parámetros de caracterización se puede observar que los resultados obtenidos en ésta investigación guardan relación y concordancia con los estudios equivalentes ya mencionados (15,17,18), pudiéndose inferir que exista la posibilidad que nuestros fagos compartan características estructurales y/o genéticas con los fagos aislados en dichos estudios, por ejemplo, que el material genético sea posiblemente ADN de doble cadena.

Sin embargo, no se puede establecer a ciencia cierta cuales son las características estructurales y genéticas de los fagos del presente estudio sin antes someterlos a otros ensayos de caracterización tales como microscopía electrónica la cual permitirá identificar la forma y estructura de los bacteriófagos y por ende nos permitirá clasificarla en una familia

determinada, o al PCR, el cual permitirá determinar la secuencia específica del material genético.

Por otro lado, aunque no hay evidencia de investigaciones sobre fagos específicos contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en Perú, sí las hay utilizando otras bacterias huésped. Tamariz J y col. en el 2014 aislaron 10 bacteriófagos contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a partir de muestras clínicas efluentes hospitalarios y además evaluó su actividad terapéutica en ratones (70). Meza A. en el 2016 aisló y caracterizó bacteriófagos líticos específicos contra cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii*, hallando periodos de latencia entre 20 y 35 min y tamaños de explosión entre 3 y 281 UFP/UFC (71). Fernández C. y col. en el 2017 aislaron y caracterizaron un bacteriófago altamente lítico para *Vibrio alginolyticus* obteniendo un periodo de latencia de 20 minutos y un tamaño de explosión de 192 UFP/UFC (72). Flores V. en el mismo año aisló un bacteriófago lítico capaz de infectar a *Vibrio fluvialis* cuyo periodo de latencia fue de 20 minutos y su tamaño de explosión de 602 UFP/UFC (73).

Finalmente, tomando en cuenta los resultados obtenidos de los parámetros evaluados de los fagos aislados en nuestra investigación, podríamos evaluar la posibilidad de un futuro uso de estos en fagoterapia, ya que se han encontrado características adecuadas para el desarrollo de preparados dirigidos al tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo-resistente.

Cabe resaltar que la limitación del estudio fue básicamente la falta de recursos necesarios para realizar ensayos de caracterización más

específicos tales como la microscopía electrónica de transmisión y el PCR.

VIII. CONCLUSIONES

- Se aislaron 10 lisados de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo-resistente a partir de muestras de agua de los ríos Rímac y Chillón.
- Los periodos de latencia oscilaron en general entre 0 y 10 minutos a excepción del fago LC4 cuyo periodo de latencia fue de 55 minutos. Los tamaños de explosión o “*burst size*” variaron desde valores de 15 UFP/célula hasta 3688 UFP/célula.
- Las tasas de adsorción oscilaron entre $1,91 \times 10^{-9}$ mL/min (valor más pequeño y correspondiente al lisado LR5) y $1,32 \times 10^{-8}$ mL/min (valor más grande y correspondiente al lisado LR4).
- Se evaluó la estabilidad térmica a 50°C, 60°C, 70°C y 80°C de los fagos de cuatro lisados, donde el fago LR2 mostró una buena estabilidad térmica a 50°C y mostró ser estable a 60°C y 70°C por un corto periodo de tiempo.
- La presencia del Ca^{+2} tiene efecto en la tasa de adsorción de los lisados LR2, LR3 y LC3; resultando en un aumento de la tasa de adsorción en el lisado LR2, una disminución de la tasa de adsorción en el lisado LR3 y un valor similar en las tasas de adsorción en el lisado LC3.

IX. RECOMENDACIONES

- Se recomienda someter a estudios de microscopía electrónica y secuenciación genómica para identificar los posibles tipos de fagos presentes en los lisados obtenidos para caracterizarlos específicamente.
- Una vez caracterizados los fagos, se recomienda enfrentarlos a un mayor número de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* para poder establecer los rangos de hospedero ("*Host range*") para fines terapéuticos.
- Realizar estudios de estabilidad a diferentes pH, esto es importante ya que nos permitirá conocer a qué tipo de procesos podemos someter a los bacteriófagos y por cual vía de administración podremos aplicarlos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antimicrobial resistance [Internet]. World Health Organization. [citado el 10 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. WHO | Race against time to develop new antibiotics [Internet]. WHO. [citado el 10 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/89/2/11-030211/en/>
3. Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. J Infect Dev Ctries. 2014; 8(2):129-136.
4. WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Internet]. WHO. [citado el 10 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
5. Apac CG. Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. Acta Med Per. 2012; 29(2):99-103.
6. Sausseureau E, Debarbieux L. Bacteriophages in the experimental treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. Adv Virus Res. 2012; 83:123-41.
7. Krylov VN. Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. Adv Virus Res. 2014; 88:227-78.
8. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev Soc Bol Ped. 2012; 51(2):109-24.
9. Andrade SS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year

report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). J Antimicrob Chemother. 2003; 52(1):140-1.

10. Moellering RC. Discovering new antimicrobial agents. Int J Antimicrob Agents. enero de 2011;37(1):2–9.

11. Chanishvili N. Phage Therapy—History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. Adv Virus Res. 2012; 83:3-40.

12. Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, et al. Clinical Aspects of Phage Therapy. Adv Virus Res. 2012; 83:73-121.

13. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. Trends Biotechnol. 2010;28(12):591–5.

14. Santos TMA, Ledbetter EC, Caixeta LS, Bicalho MLS, Bicalho RC. Isolation and characterization of two bacteriophages with strong in vitro antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with ocular infections. Am J Vet Res. 2011;72(8):1079–86.

15. Karumidze N, Thomas JA, Kvatadze N, Goderdzishvili M, Hakala KW, Weintraub ST, et al. Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;94(6):1609–17.

16. Kwiatek M, Mizak L, Parasion S, Gryko R, Olender A, Niemcewicz M. Characterization of five newly isolated bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. Folia Microbiol (Praha). 2015;60(1):7–14.

17. Cao Z, Zhang J, Niu YD, Cui N, Ma Y, Cao F, et al. Isolation and Characterization of a “phiKMV-Like” Bacteriophage and Its Therapeutic Effect on

Mink Hemorrhagic Pneumonia. Vadivelu J, editor. PLOS ONE. 2015;10(1):e0116571.

18. Didamony GE, Askora A, Shehata AA. Isolation and Characterization of T7-Like Lytic Bacteriophages Infecting Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Egypt. Curr Microbiol. 2015;70(6):786–91.

19. Alsaffar M, Jarallah EM. Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Infecting *Pseudomonas aeruginosa* From Sewage water. Int J PharmTech Res. 2016;9(9):20-30.

20. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2016. ECDPC. [citado el 8 de julio de 2018]. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>.

21. GLASS | Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report [Internet]. WHO. [citado el 8 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report/en/>

22. World Health Organization. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. [Internet]. 2015 [citado el 8 de julio de 2018]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/163468/1/9789241564946_eng.pdf?ua=1&ua=1

23. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. Cureus 2017; 9(6):e1403.

24. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future [Internet]. World Bank. [citado el 8 de julio de 2018]. Disponible en:

<http://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistant-infections-a-threat-to-our-economic-future>

25. World Health Organization, Regional Workshop on Antimicrobial Resistance (AMR) in South-East Asia was held in Penang, Malaysia on 26-28 March 2018 [Internet]. SEARO. [citado el 8 de julio de 2018]. Disponible en: [http://www.searo.who.int/antimicrobial_resistance/documents/regional-](http://www.searo.who.int/antimicrobial_resistance/documents/regional-workshop-on-antimicrobial-resistance-march-2018/en/)

[workshop-on-antimicrobial-resistance-march-2018/en/](http://www.searo.who.int/antimicrobial_resistance/documents/regional-workshop-on-antimicrobial-resistance-march-2018/en/)

26. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. World Health Organization. [citado el 8 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

27. WHO | Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis [Internet]. WHO. [citado el 8 de julio de 2018]. Disponible en: http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en/

28. Martens E, Demain AL. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J Antibiot (Tokyo)*. 2017;70(5):520–6.

29. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC [Internet]. 2018 [citado el 10 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>

30. Rather IA, Kim B-C, Bajpai VK, Park Y-H. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(4):808–12.

31. World Health Organization, editor. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014. 232 p.
32. Country Profile, Peru: Antimicrobial Resistance | PAHO WHO [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2015 [citado el 8 de julio de 2018]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1363%3A2009-perfil-pais-peru-resistencia-antimicrobiana&catid=1219%3Antimicrobial-resistance-publications&Itemid=40288&lang=en
33. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. Front Microbiol. 2014; 4:1-4.
34. Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Goff SP, editor. J Virol. 2015;89(15):7449–56.
35. Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. Rev Esp Quimioter. 2017;30(Suppl. 1):8–12.
36. Hirsch EB, Tam VH. Impact o multidrug - resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. Expert Rev Pharmacoecon Outomes Res. 2010;10(4):441–51.
37. Rossitto M, Fiscarelli EV, Rosati P. Challenges and Promises for Planning Future Clinical Research Into Bacteriophage Therapy Against *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. An Argumentative Review. Front Microbiol. 2018; 9:1-16.

38. Silva DM, Menezes EMN, Silva EV, Lamounier TAC. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. *J Bras Patol E Med Lab*. 2017;53(4):241-5.
39. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro ALL, Martino MDV, et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *Braz J Infect Dis*. 2013;17(6):672–81.
40. Dini C. Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) [Tesis Doctoral]. La Plata, Argentina: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Química Departamento de Ciencias Biológicas; 2011.
41. Shors T. Lo mejor para el final : Los bacteriófagos. En: *Virus Estudio molecular con orientación clínica*. 1a Ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2009. p. 588–602.
42. Segundo A.N, Hernández B.E, López V.O, Torres A.O. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2010;41(3):17–26.
43. Pimienta-Rodríguez ET. Tratamiento con bacteriófagos como una alternativa antimicrobiana potencial. *Rev CENIEC ciencias biológicas*. 2013; 44(2).
44. Ronda C, Vásquez M, López R. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *Revista AquaTIC*. 2003;(18):3–10.
45. Torres M. Interacciones huésped - parásito. Flora normal. En: *Temas de bacteriología y virología médica*. 2da ed. Montevideo, Uruguay: Oficina del Libro FEFMUR; 2006. p. 115–21.

46. Calendar R, editor. The bacteriophages. 2nd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2006. 746 p.
47. Leiman PG, Arisaka F, van Raaij MJ, Kostyuchenko VA, Aksyuk AA, Kanamaru S, et al. Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Virology*. 2010;7(1):355.
48. Kurtböke I. Bacteriophages. Rijeka, Croatia: InTech; 2012.
49. Clokie MRJ, Kropinski AM, editores. Bacteriophages: methods and protocols. Vol. 1; New York: Humana Press; 2009. 307 p.
50. Spricigo DA. La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de Salmonella en alimentos [Tesis Doctoral]. Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Genética y Microbiología; 2011.
51. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. 10ma Edición. Porto Alegre, Brasil: Artmed; 2010. 508 p.
52. Clokie MRJ, Kropinski AM, editores. Bacteriophages: methods and protocols. Vol. 2; New York: Humana Press; 2009. 373 p.
53. Koneman EW. Pruebas de sensibilidad a los antibióticos. En: Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color. 6ta Ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A.; 2008. p. 902–74.
54. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81.

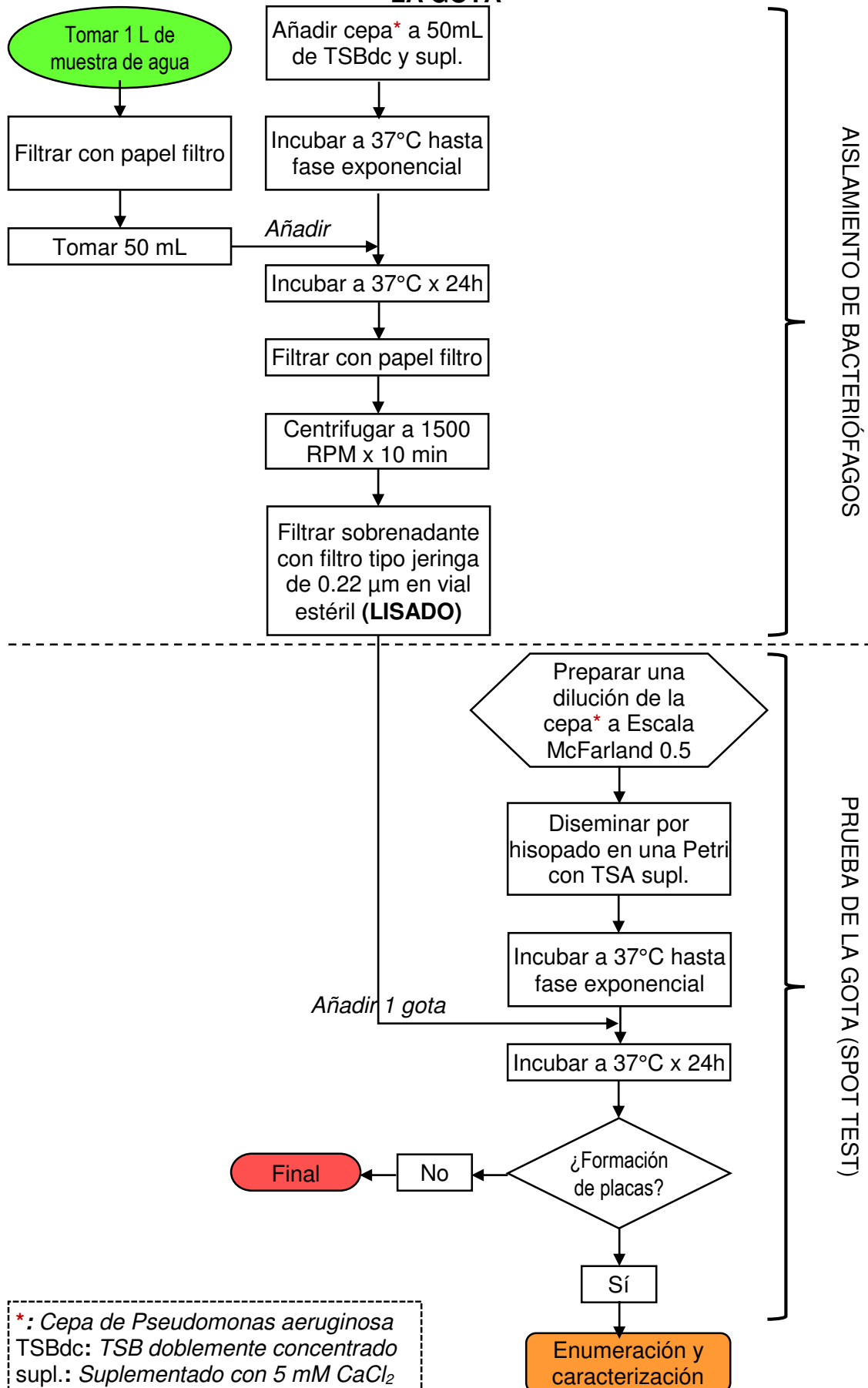
55. Reyes C. Estudio de la contaminación de las aguas del Río Chillón [Tesis de Maestría]. Lima, Perú: Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera y Metalúrgica; 2012.
56. LIMA METROPOLITANA. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvmedioambiente/temario/previo_riggo/bases/modulo_i/lima_metropolitana.htm#intro
57. Guevara M. Modelo de gestión para la recuperación de la calidad sanitaria y ambiental del Río Rímac por vertimientos domésticos [Tesis de Maestría]. [Lima, Perú]: Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ingeniería ambiental - Sección de Posgrado y Segunda especialización; 2013.
58. Subgerencia de Defensa Civil. Monitorio de los sectores críticos de la Cuenca de Río Lurín y la reducción de riesgos en el ámbito del gobierno metropolitano. Lima, Perú: Municipalidad Metropolitana de Lima; 2013 p. 12. Reporte No.: N° 058-2013/MML/SGDC/RHQM.
59. Fundación Futuro Latinoamericano - FFLA. Proceso de conformación del Consejo de Recursos Hídrico. Cuenca Interregional: Chillón-Rímac y Lurín, Perú. Una experiencia de gobernanza. Quito, Ecuador: AquaFondo. Inversión en agua para Lima; 2015 p. 96.
60. Abedon ST, Herschler TD, Stopar D. Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Resource Availability. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(9):4233–41.
61. Abedon ST, Hyman P, Thomas C. Experimental Examination of Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Bacterial Availability. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(12):7499–506.

62. Shao Y, Wang I-N. Bacteriophage Adsorption Rate and Optimal Lysis Time. *Genetics*. 2008;180(1):471–82.
63. Wang I-N, Smith DL, Young R. Holins: The Protein Clocks of Bacteriophage Infections. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54(1):799–825.
64. Abedon ST. Bacteriophage Ecology: Population growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses. New York, USA: Cambridge University Press; 2008. 508 p.
65. Fister S, Robben C, Witte AK, Schoder D, Wagner M, Rossmanith P. Influence of Environmental Factors on Phage–Bacteria Interaction and on the Efficacy and Infectivity of Phage P100. *Front Microbiol*. 2016;7:1152
66. Guglielmotti DM. Fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Caracterización y descripción de su interacción con sus cepas sensibles. [Tesis de Maestría]. Santa Fe, Argentina: Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química; 2003.
67. Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol (Praha)*. 2011;56(3):191–200.
68. Nelson DL, Cox MM. Estructura tridimensional de las proteínas. En: *Lenhninger Principios de Bioquímica*. 5ta. Ed. Barcelona, España: Ediciones Omega S.A.; 2009. p. 113–52.
69. Nelson DL, Cox MM. Nucleótidos y ácidos nucleicos. En: *Lenhninger Principios de Bioquímica*. 5ta. Ed. Barcelona, España: Ediciones Omega S.A.; 2009. p. 271–312.

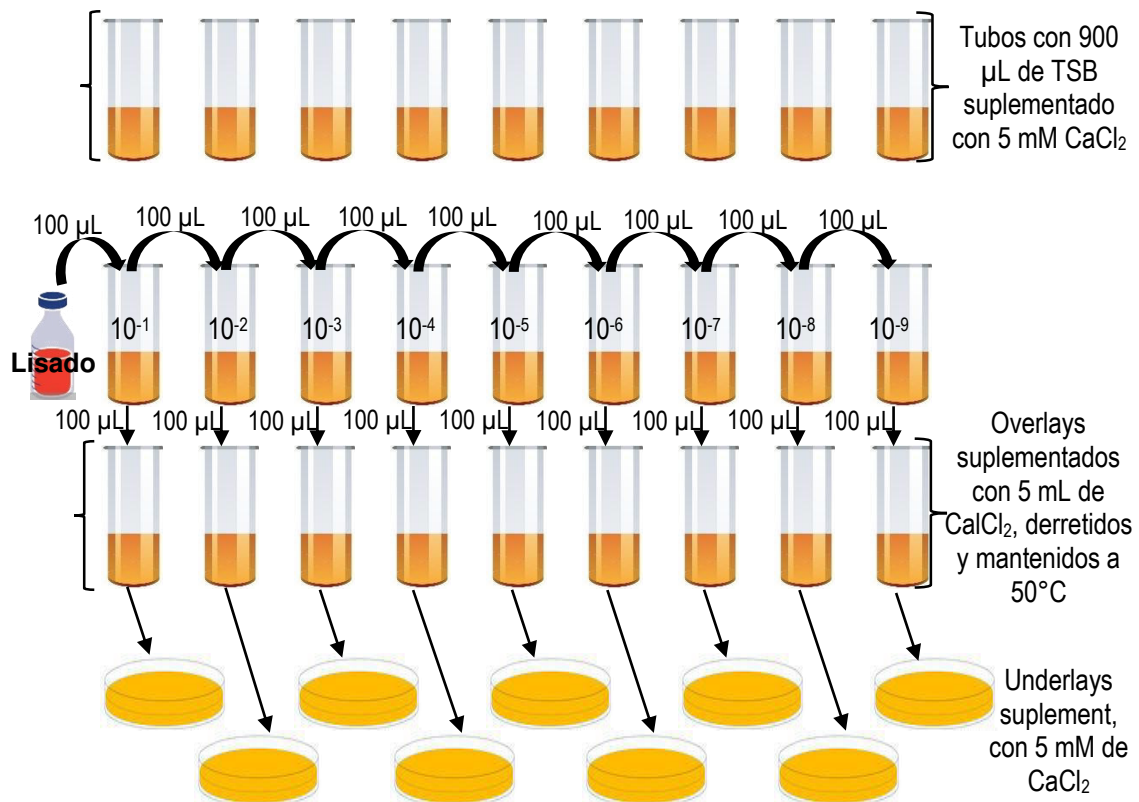
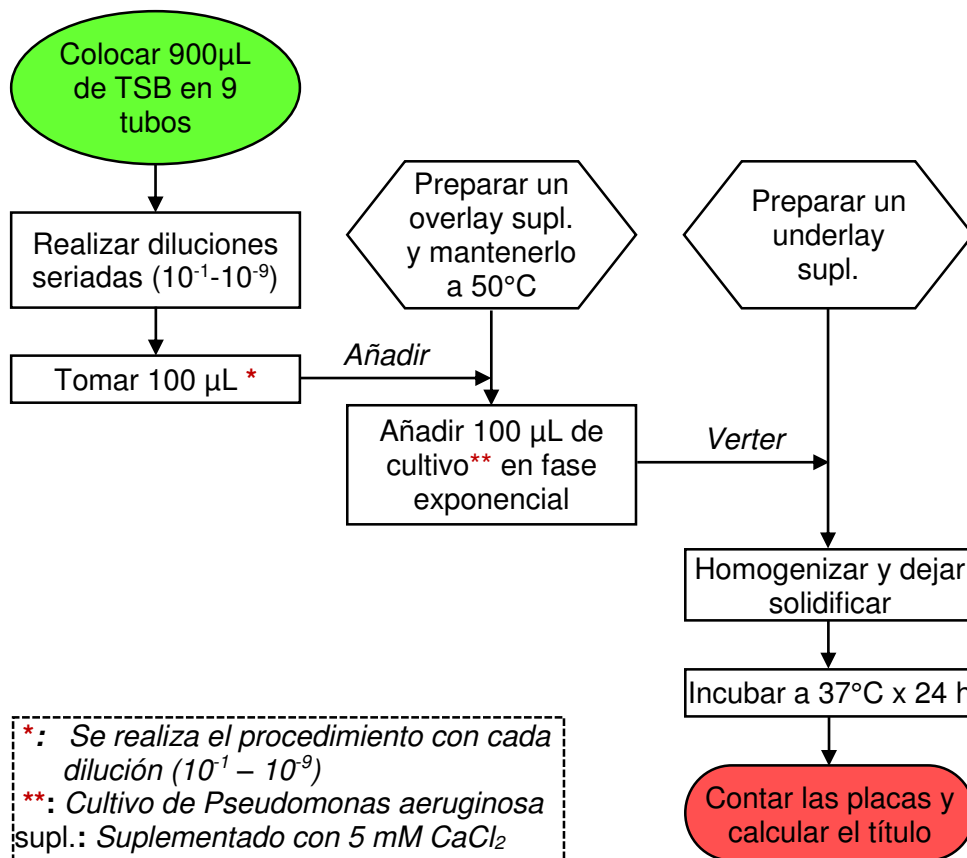
70. Tamariz JH, Lezameta L, Guerra H. Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2014; 31(1):69-77.
71. Meza A. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos para cepas nosocomiales de *Acinetaboacter baumannii* de Lima e Iquitos, Perú 2014-2015 [Tesis de Pregrado]. Arequipa, Perú: Universidad Católica de Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, bioquímicas y biotecnológicas; 2016.
72. Fernández Espinel C, Flores Dominick V, Medina Morillo M. Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. Rev Peru Biol. 2017;24(1):93.
73. Flores V. Aislamiento y caracterización de un bacteriófago con actividad lítica para *Vibrio fluvialis* [Tesis de Maestría]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2017.

ANEXOS

ANEXO I: ESQUEMA AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS Y PRUEBA DE LA GOTA

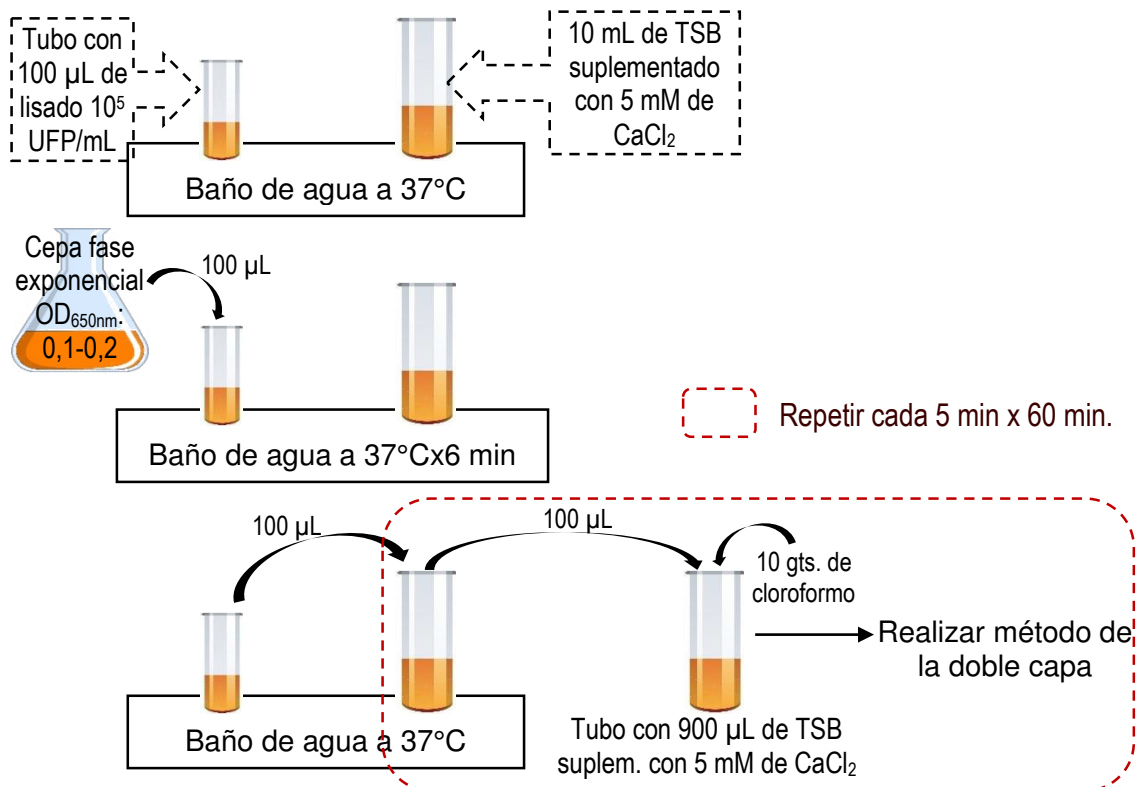
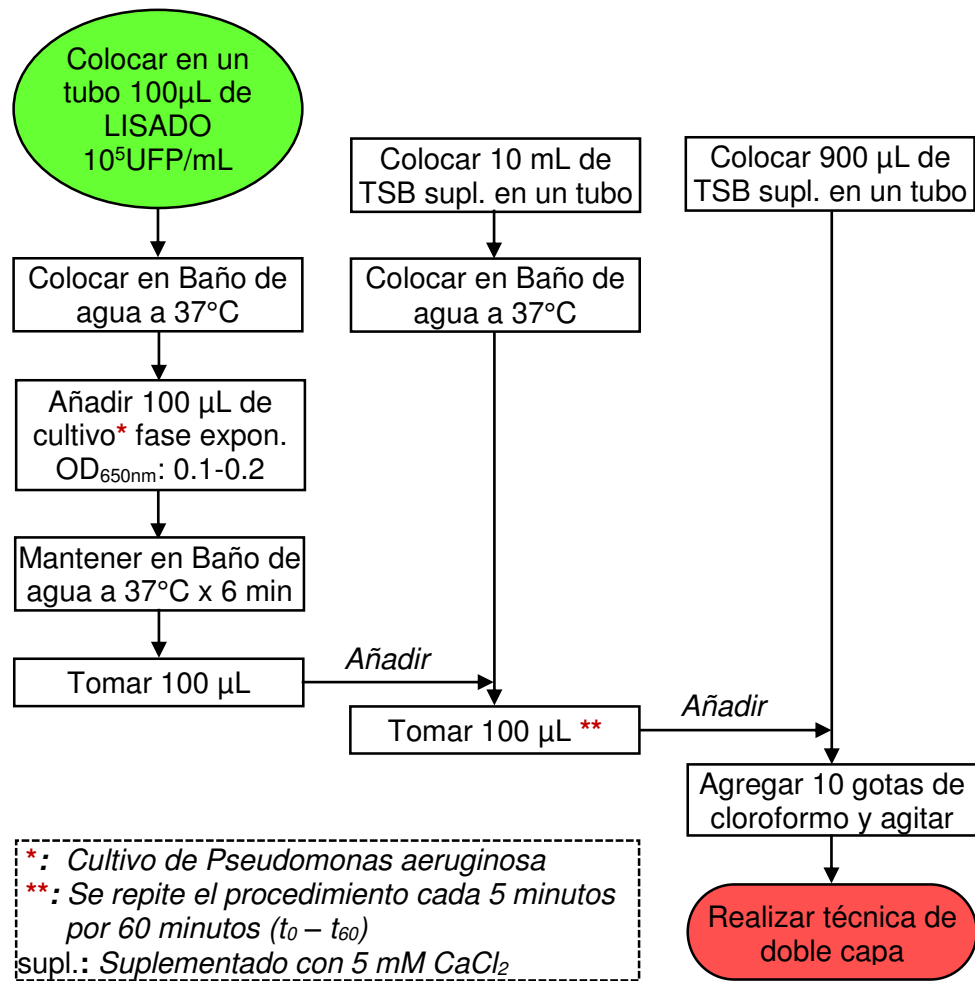


ANEXO II: ESQUEMA ENUMERACIÓN POR TÉCNICA DE LA DOBLE CAPA

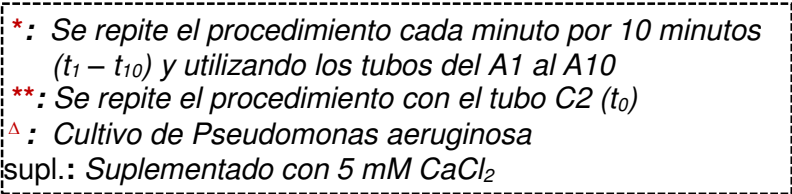


Incubar a 37°C por 24 horas. Contar placas y calcular el título.

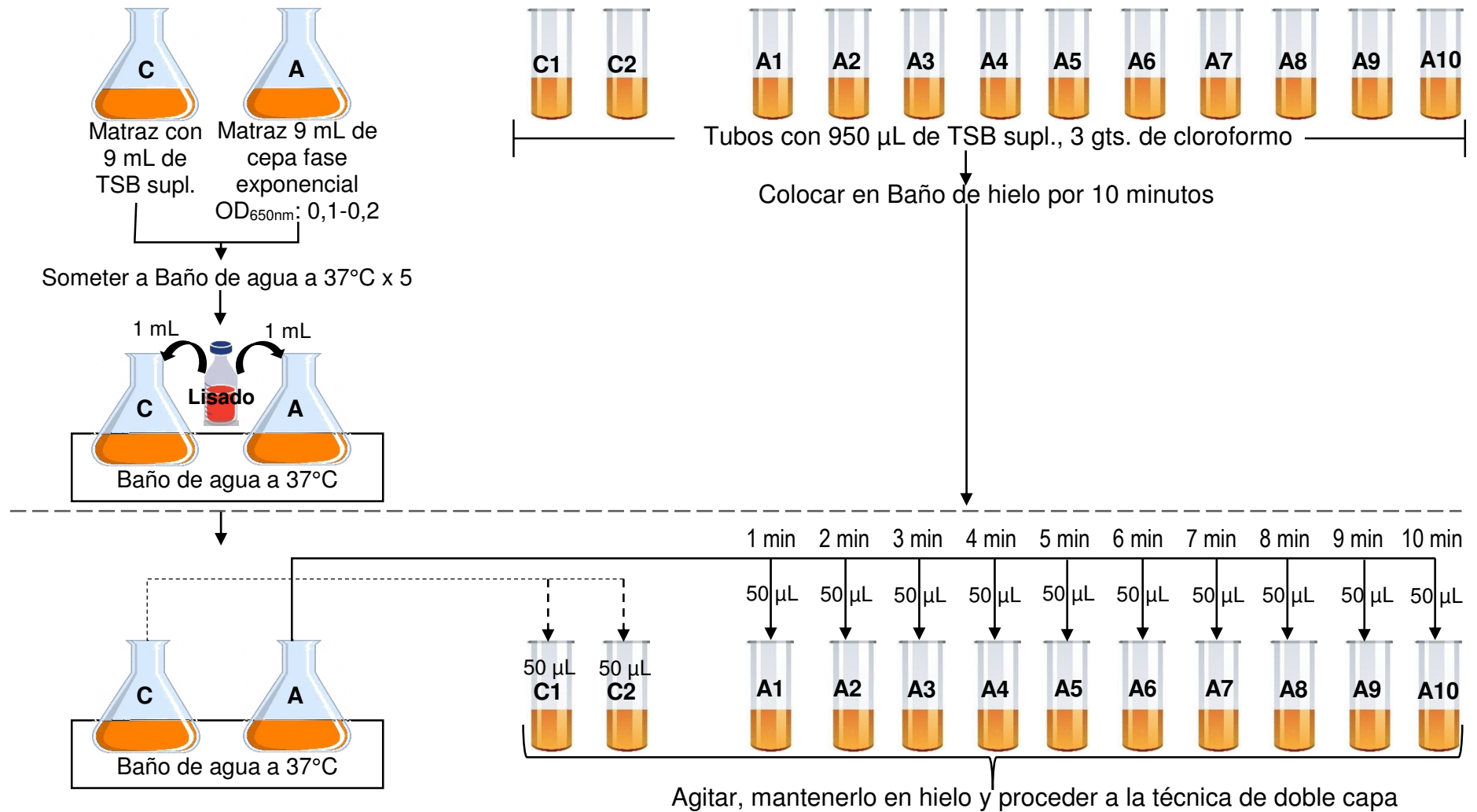
ANEXO III: ESQUEMA CINÉTICA POR CURVA DE UN SOLO PASO



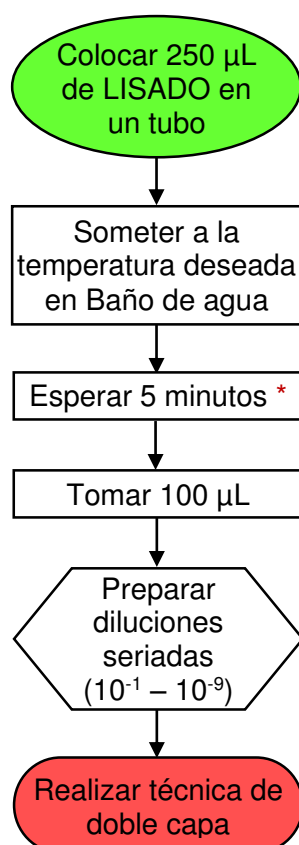
ANEXO IV: ESQUEMA CINÉTICA DE ADSORCIÓN



ANEXO IV: ESQUEMA CINÉTICA DE ADSORCIÓN (continuación)



ANEXO V: ESQUEMA EFECTO DE LA TEMPERATURA



**: Se repite el procedimiento a los 15, 30 y 60 minutos.*